

Université PARIS DESCARTES

Ecole Doctorale Médicament Chimie Toxicologie Environnement

THÈSE

Présentée par

Justine RENARD

**Conséquences à long terme d'une exposition chronique
aux cannabinoïdes durant l'adolescence chez le Rat :
Approches comportementale, fonctionnelle et structurale**

Pour obtenir le grade de : **Docteur**

Spécialité : **Neurosciences**

Soutenue le : 26 Novembre 2012

Devant la commission d'examen formée de :

Pr. Xavier Declèves.....Président
Pr. Jacques Micheau.....Rapporteur
Dr. Pascale Chavis.....Rapporteur
Dr. Amine Benyamina.....Examineur
Dr. Thérèse Jay.....Directeur de thèse
Dr. Gwenaëlle Le Pen.....Co-Directeur de thèse

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe « Physiopathologie des Maladies Psychiatriques » co-dirigée par le Dr. Thérèse Jay et le Pr. Marie-Odile Krebs, dans le Centre de Psychiatrie et Neurosciences (INSERM U894).

Je souhaite remercier les membres du jury qui me font l'honneur d'évaluer mon travail de thèse et je les prie de bien vouloir accepter le témoignage de mon profond respect:

Au Pr. Xavier Declèves qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse,

Aux Pr. Jacques Micheau et Dr. Pascale Chavis pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail,

Au Dr. Amine Benyamina pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Je leur adresse mes remerciements les plus sincères.

Je tiens à remercier très sincèrement le Dr. Thérèse Jay, qui a accepté d'encadrer ma thèse. Merci pour ta grande rigueur scientifique, ton soutien et tes qualités humaines. Tu m'as toujours accordé une grande confiance et as continuellement contribué à ma formation en me permettant notamment de participer à plusieurs congrès. Je te suis extrêmement reconnaissante pour tout ce que tu m'as apporté durant ces trois années de thèse.

Je souhaiterais également remercier le Dr Gwenaëlle Le Pen, ma co-directrice de thèse qui a su m'accorder une confiance inestimable et une grande liberté tout le long de mon travail. Merci aussi de m'avoir permis de concrétiser mon envie de réaliser une thèse.

Parce que le travail de recherche est aussi le fruit d'un travail en équipe, je tiens à remercier tous les membres qui ont participé de près ou de loin à ces travaux de recherche :

A Dorian mon binôme, pour nos pauses café, nos discussions, nos challenges du midi et les tours de magie qui apportaient un peu de fantaisie dans ce monde pas toujours facile de thésard,

A Marion, qui est devenue une grande amie, merci pour ton aide en électrophy, toi la reine du signal! Merci aussi pour ton grand soutien, ton écoute, nos fous rires, nos footings et longues balades à la cité U... Maintenant, au-delà de notre amitié, nous partageons le 13 Septembre ensemble...

A Élisabeth, pour ton soutien, ton écoute et toutes nos discussions. Merci aussi pour toutes les séances de « remise en confiance », ta patience et le temps passé pour les corrections. Merci d'avoir toujours été présente, dans les bons comme dans les mauvais moments. Vraiment, un grand merci pour tout ce que tu apportes à l'équipe,

A Pierrot et Samy, merci pour les fous rires, les petites pauses et l'énergie positive que vous avez apportées en cette fin de parcours,

A Damien, pour ton soutien, nos parties de rigolade et tes conseils... tiens, au fait, je n'ai bientôt plus de croquettes!

A Julien M qui, malgré la distance, a suivi de près cette grande aventure, merci pour tes conseils, nos discussions et ton soutien,

A Marie, pour nos discussions (scientifiques ou pas), nos échanges constructifs et tes conseils autour d'un coca, de tapas ou de sushis,

A Julie, pour ton énergie, ta bonne humeur, ton soutien, tes One Woman Show et tes suggestions théâtre ou ciné toujours au top!

A Arnaud, pour tes conseils et ta sympathie,

Merci à Danlei, pour ta gentillesse, ta patience lors des Western blots et tes massages du cuir chevelu exceptionnels qui me faisaient passer la migraine mieux que de l'ibuprofène,

Thanks to Bill for your sympathy, your travel tips and our common cat passion. I wish you lots of success in your scientific career,

Merci à Oussama pour tes conseils et nos discussions passionnantes notamment sur les troubles psychiatriques,

Je tiens aussi à remercier tous les autres membres du centre : Caroline (pour ta bonne humeur et tous tes «bons plans»), Philippe Zizzari (pour ta sympathie et ta disponibilité), Rim (pour ton soutien et nos repas décompress' certains midis), Chloé, Alice et Dominique (désolée pour les fausses joies procurées quand je pensais ne plus avoir de séries de rats!) Julie Cognet (pour ton aide technique lors de mes dernières manips), François Maillet, Madame Yvonne et Nadia,

A tous mes amis qui m'ont accompagnée dans ce voyage tumultueux et qui m'ont toujours encouragée: un grand merci notamment à Do, Nico, Marie, Tom, Julie, Claire et Audrey pour les week-ends à rire de tout et de rien. Tous ces moments passés en votre compagnie me permettaient considérablement de recharger mes batteries. A vous tous, un grand merci pour la force et le soutien que vous m'avez apportés tout au long de cette thèse,

A mes parents, pour m'avoir toujours soutenue durant mes études, merci pour votre confiance et votre grande patience. Merci de m'avoir toujours appuyée dans mes choix et de m'avoir sans cesse donné les moyens de réussir. Enfin, ça y est, les études, c'est terminé!

A mon frère Guillaume et sa femme Noémie, pour tout ce qu'ils m'ont apporté, les fous rires, les footings le dimanche, les voyages à New York et à Tokyo. Merci pour le soutien, le souffle et la force que vous m'avez procurés,

A Maria, Katia et David pour leur soutien, les week-ends autour d'un bon resto, sur une moto ou au bord de l'eau. Merci pour l'énergie positive que vous m'avez apportée,

A Vlady, mon étoile bienveillante, à qui je dédie cette thèse. Tu es parti trop tôt pour savourer la victoire mais tu vois, j'ai foncé, je ne me suis pas retournée et j'y suis arrivée...Merci pour tout.

Bien évidemment, à Sylvain, merci pour tout ce que tu es, pour ton soutien inégalable, ton écoute, ta grande patience et tes conseils judicieux. Merci pour tout l'amour et la force que tu m'apportes chaque jour. Sans toi, la saveur de cette thèse n'aurait pas été la même. Nous allons enfin pouvoir commencer à écrire un nouveau chapitre de notre vie.

Table des matières

Introduction bibliographique.....	1
Chapitre I Le système cannabinoïde.....	1
I. Généralités.....	1
II. La découverte du système cannabinoïde.....	2
III. Le système cannabinoïde.....	3
A. Les récepteurs aux cannabinoïdes.....	3
1. Les récepteurs CB1 (RCB1).....	3
a. Gènes et protéines.....	3
b. Distribution des RCB1.....	4
2. Les récepteurs CB2 (RCB2).....	6
a. Gènes et protéines.....	6
b. Distribution des RCB2.....	6
3. Voies de signalisation intracellulaires.....	6
a. Inhibition de l'adenylate cyclase.....	6
b. Activation de la voie des Map Kinases.....	7
c. Contrôle de la perméabilité de certains canaux ioniques.....	7
4. Les autres récepteurs aux cannabinoïdes.....	8
a. Le récepteur vanilloïde.....	8
b. Le récepteur GRP55.....	8
B. Les endocannabinoïdes.....	9
1. L' Anandamide.....	9
2. Le 2 arachidonyl-glycerol (2-AG).....	10
C. Les phytocannabinoïdes	11
1. Pharmacocinétique du Δ 9-THC.....	12
a. Absorption.....	12
b. Distribution tissulaire.....	12
c. Métabolisme.....	13
d. Elimination/Excrétion.....	14
2. Dosage du THC et dépistage.....	15
D. Les cannabinoïdes synthétiques.....	16
1. Les cannabinoïdes sélectifs.....	16
2. Les cannabinoïdes non classiques.....	16
3. Les amyloalkilindoles.....	16
4. Les dérivés pyrazols.....	17
Chapitre II Endocannabinoïdes, développement et plasticité synaptique.....	19
I. Endocannabinoïdes et développement.....	19
A. Les endocannabinoïdes au stade prénatal et postnatal précoce.....	19
B. Les endocannabinoïdes durant l'adolescence.....	21
1. Neurobiologie de l'adolescence.....	21
2. Système endocannabinoïde et adolescence.....	22
II. Cannabinoïdes, transmission et plasticité synaptique.....	23
A. Cannabinoïdes endogènes, exogènes et transmission synaptique.....	23

B. Cannabinoïdes endogènes, exogènes et plasticité synaptique.....	25
1. Brefs rappels sur la définition de la PLT et de la DLT dépendante des récepteurs NMDA.....	25
2. La DLT dépendante des endocannabinoïdes.....	27
a. Mécanisme de la DLT-endoCB.....	27
b. Facilitation de la PLT par la DLT-endoCB.....	29
C. Interaction entre cannabinoïdes exogènes, cannabinoïdes endogènes et plasticité synaptique.....	30
Chapitre III Epidémiologie.....	32
I. Utilisation et consommation de cannabis : bref historique.....	32
II. La consommation de cannabis de nos jours.....	33
A. Recueil des données.....	33
B. Consommation de cannabis en Europe et dans le Monde.....	34
1. En Europe.....	34
a. En population générale.....	34
b. Chez les jeunes adultes et les adolescents.....	35
2. Consommation de cannabis dans le reste du monde.....	35
C. Consommation de cannabis en France.....	36
1. En population générale.....	36
2. Chez les adolescents.....	36
III. Motifs et modes de consommation du cannabis.....	39
IV. Précocité des consommations et problème de santé publique.....	39
Chapitre IV Les troubles induits par la consommation de cannabis	41
I. Les conséquences d'une consommation aiguë de cannabis.....	41
A. L'ivresse cannabique	41
B. Altérations cognitives	42
C. Altérations psychomotrices.....	42
D. Autres manifestations somatiques.....	42
II. Les conséquences d'une consommation chronique au cannabis :	
L'adolescent est-il en danger ?.....	42
A. Troubles cognitifs.....	42
B. Troubles psychiatriques.....	43
1. Cannabis et troubles anxieux.....	43
2. Cannabis et troubles dépressifs.....	44
3. Cannabis et syndrome amotivationnel.....	44
4. Cannabis et psychose cannabique.....	44
5. Cannabis et troubles schizophréniques.....	45
a. Fréquence de la comorbidité associant consommation de cannabis et schizophrénie.....	45
b. Le cannabis : facteur de risque pour le développement de la schizophrénie ?.....	45
c. Bases neurobiologiques de l'association entre consommation de cannabis et schizophrénie	47
Récepteurs cannabinoïdes.....	47

Endocannabinoïdes.....	47
Vulnérabilité au cannabis.....	48
III. Les effets comportementaux induits par l'exposition aux cannabinoïdes chez l'animal.....	49
A. Exposition aiguë aux cannabinoïdes.....	49
B. Exposition chronique aux cannabinoïdes durant l'adolescence	49
1. Tests comportementaux utilisés pour la recherche des comportements anormaux en relation avec les pathologies psychiatriques.....	50
a. Evaluation des performances cognitives.....	50
b. Evaluation de la dimension psychotique.....	50
c. Evaluation des comportements sociaux.....	51
d. Evaluation du comportement moteur.....	51
e. Evaluation de la dimension dépressive.....	51
f. Evaluation de l'anxiété.....	51
2. Etudes des conséquences à long terme d'une exposition aux cannabinoïdes durant l'adolescence chez le Rat.....	51
a. Evaluation des performances cognitives.....	54
b. Evaluation du filtrage sensorimoteur.....	54
c. Evaluation de troubles anxieux.....	55
d. Comportement de résignation.....	55
Chapitre V Objectifs de l'étude.....	56
Matériel et Méthodes.....	58
A. Animaux	58
B. Préparation et administration de la drogue.....	58
1. Préparation.....	58
2. Administration.....	59
a. Traitement durant l'adolescence.....	59
b. Traitement durant l'âge adulte.....	59
C. Tests comportementaux.....	59
1. Test de la reconnaissance d'objets.....	59
a. Principe du test.....	59
b. Dispositif expérimental et protocole.....	59
2. Test de la localisation d'objets.....	61
a. Principe du test.....	61
b. Dispositif expérimental et protocole.....	62
D. Electrophysiologie : Potentialisation à long terme de la voie Hippocampe-Cortex préfrontal.....	63
E. Neurohistologie par la coloration de Golgi.....	65
F. Etude biochimique.....	68
1. Dissection des structures cérébrales.....	68
2. Préparation des échantillons.....	68
3. Western Blot.....	68
G. Analyses statistiques.....	68

Articles et résultats expérimentaux.....	70
Article 1: Long-term cognitive impairments induced by chronic cannabinoid exposure during adolescence in rats: a strain comparison.....	70
Contexte.....	70
Objectifs.....	70
Résultats principaux.....	71
Résultats complémentaires non présentés dans l'article 1	83
Article 2:	89
Contexte.....	89
Objectifs.....	89
Résultats principaux.....	90
Discussion générale.....	108
A. Mise au point du modèle animal.....	109
1. Définir la fenêtre de vulnérabilité de l'adolescence chez le rat.....	109
2. Choix de l'agoniste et des doses.....	110
3. Choix de la souche de rats.....	110
B. L'adolescence est-elle une période de vulnérabilité pour les effets des cannabinoïdes?.....	111
1. Mise en évidence de déficits cognitifs à long terme.....	111
2. Déficits dans l'expression de la PLT hippocampe-CPF à l'âge adulte.....	112
3. Modifications de la morphologie des neurones de la couche II/III du CPF...	113
4. Diminution de l'expression de PSD95 dans le CPF.....	114
C. Conclusion : Un modèle animal pour l'étude de la schizophrénie?.....	116
D. Hypothèses des mécanismes sous-jacents aux effets délétères d'une exposition aux cannabinoïdes exogènes sur les processus cognitifs.....	116
E. Perspectives.....	118
Bibliographie.....	120

Liste des publications et communications

Liste des manuscrits publiés et en préparation en lien direct avec le travail de thèse

Long-term cognitive impairments induced by chronic cannabinoid exposure during adolescence in rats: a strain comparison.

Justine Renard, Marie-Odile Krebs, Thérèse M Jay, Gwenaëlle Le Pen.
Psychopharmacology 2012 Sept 16

Chronic cannabinoid exposure during adolescence causes long-term synaptic and structural changes in rat prefrontal cortex.

Justine Renard, Tania Vitalis, Marion Rame, Marie-Odile Krebs, Gwenaëlle Le Pen, Thérèse M Jay.
En préparation (pour soumission prochaine)

Liste des travaux exposés lors de congrès nationaux et internationaux

Chronic cannabinoid exposure during adolescence causes long-term synaptic and structural changes in rat prefrontal cortex.

Renard J, Vitalis T, Rame M, Godsil BP, Krebs MO, Lenkei Z, Le Pen G, Jay TM.
Society for Neurosciences, 42th Annual meeting, New Orleans, USA, October 13-17, 2012.

Behavioral consequences of chronic adolescent vs. adult cannabinoid exposure after prenatal stress in female rats.

Renard J, Krebs MO, Jay TM, Le Pen G.
43rd European Brain and Behaviour Society (EBBS), Seville, Spain, September 9-12, 2011.

Conséquences cognitives à long terme d'une exposition chronique aux cannabinoïdes pendant l'adolescence chez le rat.

Renard J, Krebs MO, Le Pen G, Jay TM.
Grand colloque de l'agence nationale de la recherche (ANR) Biologie & santé 2011, Lyon, France, 5-7 juillet 2011.

Chronic cannabinoid exposure during adolescence induces cognitive impairments in rats at adulthood: comparison between Lister Hooded and Wistar rats.

Renard J, Krebs MO, Jay TM, Le Pen G.
10th meeting of French Neurosciences Society, Marseille, France, May 24-27, 2011.

Long-term cognitive consequences of chronic cannabinoid exposure during adolescence in two different strains of rats.

Renard J, Krebs MO, Jay TM, Le Pen G.
9^{ème} congrès de l'Encéphale, Paris, France, 19-21 Janvier 2011.

Long-term cognitive impairments induced by chronic cannabinoid exposure during puberty: a strain comparison.

Renard J, Krebs MO, Jay TM, Le Pen G.
9th FENS Forum of European Neurosciences, Amsterdam, Netherlands, July 3-7, 2010.

Liste des abréviations

Aa : Acides aminés
Ac : Adenylate Cyclase
ACEA : Arachidonyl-2'ChloroEthylAmide
ACPA : ArachidonylCycloPropylAmide
ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique
AEA : ArachidonoylEthanolAmide ou Anandamide
2-AG : 2-ArachidonoylGlycérol
AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-m'éthylisoazol-4-propionate
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor
BLA : Amygdale BasoLatérale
CaM kinase II : protéine kinase II calmoduline-dépendante
CB : CannaBinoïde
CCK : CholécystoKinine
CFES : Comité Français d'Education pour la Santé
CPF : Cortex PréFrontal
CREB : CRE-Binding protein
COMT : Catéchol-O-Méthyltransférase
CRF : Corticotropin-Releasing Factor
DA : DopAmine
DAergique : DopAminergique
DAG : Di-Acyl-Glycérol
 Δ 9-THC : Δ 9-TétraHydroCannabinol
DISC1 : Disrupted In Schizophrenia 1
DLT: Dépression à Long Terme
DLT-endoCB : Dépression à Long Terme induite par les endocannabinoïdes
DSE : Dépolarisation qui induit la Suppression de l'Excitation
DSI : Dépolarisation qui induit la Suppression de l'Inhibition
DSMIV : 4^{ème} édition du Manuel Diagnostique et Statistique des troubles mentaux
DTM : Domaine Trans-Membranaire
endoCB : EndoCannaBinoïde
ERK1/2 : Extracellular signal-Regulated protein Kinases 1 et 2
ESCAPAD : Enquête sur la Santé et les Consommations lors de l'Appel de Préparation à la Défense
ESPAD : European School Survey Project on Alcohol and other Drugs
FAAH : Fatty Acid Amide Hydrolase
FAK : Focal Adhesion Kinase
GABA : Acide Gamma Amino Butyrique
GAD : Glutamic Acid Decarboxylase
GAP-43 : Growth Associated Protein 43
Gi : Protéine G Inhibitrice
GRM3 : Metabotropic type II Glutamate Receptor

GRP55 : G-Protein-coupled Receptor 55
HBSC : Health Behaviour in School-aged Children
HFS : High Frequency Stimulation (stimulations à haute fréquence)
HPA : Hypothalamo-Hypophyse-corticossurénales
IP3 : Inositol-Triphosphate
IRM : Imagerie à Résonance Magnétique
JAPD : Journée d'Appel de Préparation à la Défense
JDC : Journée Défense et Citoyenneté
JNK : JuN Kinase
JPN : Jour Postnatal
HEK : Human Embryonic Kidney
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
LFS : Low Frequency Stimulation (stimulations à faible fréquence)
Lyso-PI : 2-Arachidonoyl-Lysophospholipide
MAP : Mitogen Activated Protein
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MET : Méthionine
MGL : MonoacylGlycérade Lipase
MgluR : Metabotropic Glutamate Receptor
MILDT : Mission Interministérielle de Lutte contre la Drogue et la Toxicomanie
MJENR : Ministère de la Jeunesse, de l'Éducation Nationale et de la Recherche
NAPE : N-Arachidonoyl-Phosphatidyl-Ethanolamide
Nacc : Noyau ACCumbens
NAT : N-Acyl Transférase
NfκB : Nuclear Factor Kappa B
NGF : Nerve Growth Factor
NHSDA : National Household Survey on Drug Abuse
NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate
NRG1 : NeuRegulin 1
OEDT : Observatoire Européen des Drogues et des Toxicomanies
OFDT : Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PE : Phosphatidyl-Ethanolamine
PhytoCB: PhytoCannaBinoïde
PI : PhosphatidyInositol
PLA1 : PhosphoLipase A1
PIPx: Phospholipids precursors
PKA : Protéine Kinase A
PKB : Protéine Kinase B (=Akt)
PKC : Protéine Kinase C
PLC : Phospholipase C
PLD : Phospholipase D
PLT : Potentialisation à Long Terme
PPSE : Potentiel Postsynaptique Excitateur

PPSI : Potentiel PostSynaptique Inhibiteur
PSD : PostSynaptic Density
RCB1 : Récepteurs aux cannabinoïdes de type 1
RCB1h : Récepteur aux cannabinoïdes de type 1 humain
RCB2 : Récepteurs aux cannabinoïdes de type 2
RCB2h : Récepteur aux cannabinoïdes de type 2 humain
RGS4 : Regulator of G Protein Signaling 4
SAMHSA : Substance Abuse and Mental Health Services Administration
SHF: Stimulations à Haute Fréquence
SNAP-25 : Synaptosomal-Associated Protein 25
SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SNC : Système Nerveux Central
SNIPH : Institut National Suédois de Santé Publique
TBS : Tris Buffer Saline
TEP : Tomographie à Emission de Positons
THC : TétrahydroCannabinol
TREND : Tendances Récentes Et les Nouvelles Drogues
TRPV1 : Transient Receptor Potential Vanilloid 1
VAL : Valine
VAMP : Vesicle-Associated Membrane Proteins
VGLUT3 : Transporteur au GLUTamate de type 3
ZNF804A : Zinc Finger Protein 804A

Liste des tableaux et des figures

Introduction bibliographique

Figure 1 : Représentation de la plante Cannabis Sativa (Plants mâles et femelles)

Tableau 1 : La course à la découverte du système cannabinoïde

Figure 2 : Structure du gène *Cnr1* humain

Figure 3 : Récepteurs CB1 et CB2

Figure 4 : Distribution du RCB1 dans le système nerveux central et dans la moelle épinière de souris sauvage adulte et de souris mutantes délétées pour le récepteur CB1

Figure 5 : Les différentes voies de signalisation intracellulaire

Figure 6 : Synthèse et dégradation de l'anandamide

Figure 7 : Synthèse et dégradation du 2-AG

Figure 8 : Structure chimique du Δ^9 -TetraHydroCannabinol (Δ^9 -THC ou THC)

Figure 9 : Pharmacocinétique du THC après inhalation

Figure 10 : Concentrations plasmatiques de Δ^9 -THC, de 11-OH- Δ^9 -THC et de Δ^9 -THC-COOH en fonction du temps après inhalation d'une cigarette de cannabis contenant 3,55% de Δ^9 -THC

Figure 11 : Concentrations des principaux métabolites du Δ^9 -THC dans les différentes voies d'élimination et milieux biologiques

Figure 12 : Structure chimique du CP55, 940 et du HU210

Figure 13 : Structure chimique du WIN55, 212-2

Tableau 2 : Affinités comparées des différents agonistes et antagonistes des RCB1 et RCB2

Figure 14 : Autoradiographie et hybridation in situ dans des cerveaux de fœtus de rat au 21^{ème} jour de gestation (JG21), 1er jour postnatal (JPN1), 5ème jour postnatal (JPN5) et à l'âge adulte.

Figure 15 : Rôle du système endoCB lors du développement du SNC

Figure 16 : Résumé schématique de la DSI au sein d'une synapse inhibitrice et de la DSE au sein d'une synapse excitatrice

Figure 17 : Schéma de l'induction de la PLT et de la DLT au sein d'une synapse excitatrice

Figure 18 : Schéma illustrant les différentes DLT induites par les endoCB

Figure 19 : Le peintre Daumier, participant aux « fantasias », aimait dessiner et caricaturer les membres du « Club de Haschischins » pendant les séances/ Couverture du livre de Moreau de Tours « Du haschich et de l'aliénation mentale », publié en 1845, premier ouvrage scientifique traitant des drogues et de leurs effets sur le corps humain

Tableau 3 : Prévalence de la consommation de cannabis dans la population générale- Résumé des données Européennes

Figure 20 : Proportions de consommateurs de cannabis en France au cours de la vie suivant l'âge et le sexe

Figure 21 : Evolution des usages de cannabis déclarés au cours du mois (en %) selon le sexe en France entre 1999 et 2011 chez les adolescents de 15 et 16 ans

Figure 22 : Cartographie de l'usage de cannabis au cours du mois en 2011 en Europe chez les jeunes âgés de 15 et 16 ans

Figure 23 : Evolutions des usages de cannabis en France de 2000 à 2011 chez les adolescents de 17 ans en France

Figure 24 : Diverses affiches pour des campagnes de prévention concernant la consommation de cannabis chez les adolescents

Tableau 4 : Les différents modèles animaux utilisés pour l'étude des conséquences à long terme d'une exposition aux cannabinoïdes durant l'adolescence chez le rat

Matériel et Méthodes

Figure 1 : Rat de souche Lister Hooded et de souche Wistar

Figure 2 : Objets utilisés dans les tests de reconnaissance d'objets et de localisation d'objets

Figure 3 : Principe du test de la reconnaissance d'objets

Figure 4 : Rat qui explore l'objet familier en phase d'acquisition T1

Figure 5 : Pièce dans laquelle se déroulent les tests de la localisation d'objets

Figure 6 : Principe du test de la localisation d'objets

Figure 7 : Rat placé dans l'appareil stéréotaxique

Figure 8 : Capture d'écran d'un potentiel de champs postsynaptique excitateur monosynaptique caractéristique dans le CPF après stimulation de l'hippocampe ventral (latence 18 ms)

Figure 9 : Zone d'intérêt du CPFm sur les coupes effectuées entre Bregma 2,7 -3,7 mm

Figure 10 : Exemple de photographies de neurones pyramidaux de la couche II/III du CPF

Figure 11 : Exemple de reconstruction manuelle d'un neurone

Figure 12 : Etude de complexité de l'arbre dendritique par calcul de DCI

Articles et résultats expérimentaux

Article 1 (Résultats complémentaires) :

Figure 1 : Test de l'inhibition du réflexe de sursaut par le prépulse sonore (PPI). Evaluation du filtrage sensoriel des rats Wistar et des rats Lister Hooded testés à l'âge adulte après un traitement chronique au CP55, 940 (CP) ou avec la solution véhicule (VEH) durant l'adolescence (JPN29 à 50)

Figure 2 : Test du labyrinthe en croix surélevée. Mesure du niveau d'anxiété (représenté par l'indice d'anxiété) des rats Wistar et des rats Lister Hooded testés à l'âge adulte après un traitement chronique au CP55, 940 (CP) ou avec la solution véhicule (VEH) durant l'adolescence (JPN 29 à 50)

Figure 3 : Test de l'activité locomotrice. Mesure de la distance totale parcourue sur une période de 60 minutes des rats Wistar et des rats Lister Hooded testés à l'âge adulte après un traitement chronique au CP55, 940 (CP) ou avec la solution véhicule (VEH) durant l'adolescence (JPN 29 à 50)

Figure 4 : Test de l'interaction sociale. Evaluation du comportement social des rats Wistar (groupe VEH n=6 ; groupe CP55, 940 n=5) et des rats Lister Hooded (groupe VEH n=6 ; groupe CP55, 940 n=5) testés à l'âge adulte

Article 2 :

Figure 1 : Effets à long terme d'un traitement chronique au CP 55,940 durant l'adolescence sur l'expression de la PLT de la voie hippocampe-CPF chez les rats à l'âge adulte

Figure 2 : Effets à long terme d'un traitement chronique au CP 55,940 durant l'adolescence sur la morphologie des neurones pyramidaux de la couche II/III du CPF des rats adultes

Figure 3 : Effets à long terme d'un traitement chronique au CP 55, 940 durant l'adolescence sur l'expression de la PSD95, de la synaptophysine et de VGLUT3 dans le CPF (A) et dans l'hippocampe (B) des rats à l'âge adulte

Discussion

Figure 1 : Hypothèse schématisée de la dysrégulation, par l'apport de cannabinoïdes durant l'adolescence, de la balance GABA/Glutamate lors de la maturation du CPF

Figure 2 : De l'étiologie aux symptômes cognitifs de la schizophrénie

Note introductive

Aujourd'hui, le cannabis est retrouvé sur presque tous les continents et connaît un succès croissant : il est le **produit illicite le plus utilisé dans le monde**, notamment chez les adolescents chez qui le nombre de consommateurs ne cesse d'augmenter. **La France n'est pas épargnée et se situe même au 1^{er} rang européen de sa consommation chez les jeunes de 15 à 16 ans.** L'innocuité initialement attribuée à cette drogue explique sans doute le peu de recherches scientifiques effectuées sur ce sujet jusqu'en 1990. Depuis, le cannabis est devenu le centre de nombreux débats politiques, médicaux et sociaux : **de multiples éléments amènent à reconsidérer les effets du cannabis à court et à long terme, en particulier lorsqu'il est consommé pendant l'adolescence, période de grande vulnérabilité neuronale.**

Afin d'appréhender ses conséquences sur le développement de la santé mentale chez l'adolescent, il est important de comprendre son action d'un point de vue neurobiologique. Le premier chapitre détaille le système cannabinoïde, les ligands endogènes et exogènes (naturels et artificiels) des récepteurs cannabinoïdes, depuis leur synthèse et leur action jusqu'à leur dégradation. Le deuxième chapitre aborde les mécanismes d'action des endocannabinoïdes et leur **rôle fondamental au cours de l'ontogénèse**. Le rôle du système cannabinoïde dans la **régulation de la plasticité synaptique** dans différentes régions cérébrales est également présenté dans cette partie. Le troisième chapitre présente les **dernières données épidémiologiques** en France, en Europe et dans le monde afin de dresser un portrait de la réalité des usages du cannabis à l'adolescence. Enfin, le 4^{ème} chapitre décrit les **conséquences de la consommation de cannabis lors de l'adolescence sur la santé mentale, à court et à long terme**. Ainsi, nous tenterons d'expliquer pourquoi la consommation de cette drogue durant cette période de vulnérabilité constitue **un problème majeur de santé publique**. Ce dernier chapitre présente également les différentes études utilisant les modèles animaux, actuellement mises en œuvre afin d'évaluer les conséquences multiples d'une exposition aux cannabinoïdes durant l'adolescence.

Première partie

Introduction bibliographique

Chapitre I. Le système cannabinoïde

I. Généralités

Cannabis sativa et sa variété *Cannabis indica* sont des plantes dicotylédones, appartenant à l'ordre des urticales et à la famille des cannabinaées. Ce sont des plantes dioïques, c'est-à-dire ne comportant que des pieds mâles ou des pieds femelles (Figure 1). L'espèce comporte plus de cent variétés dans le monde et s'adapte parfaitement aux différentes conditions de climat et de sol auxquelles elle est confrontée. Cette plante des pays chauds se protège de la sécheresse en synthétisant dans ses feuilles (dans les plants femelles) une résine qui concentre son principal cannabinoïde psychoactif, le Δ^9 -TétraHydroCannabinol (Δ^9 -THC), couramment appelé le THC.

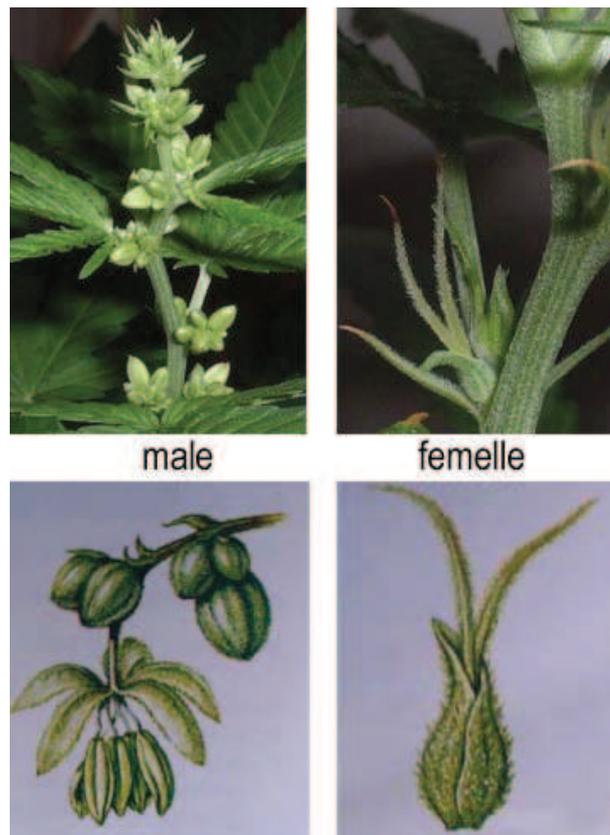


Figure 1 : Représentation de la plante *Cannabis Sativa* (Plants mâles et femelles).

II. La découverte du système cannabinoïde

Le THC a été découvert en 1964 (Mechoulam and Gaoni 1965) mais le début de la pharmacologie des cannabinoïdes ne commence réellement qu'en 1990 avec l'identification d'un récepteur orphelin couplé à la protéine G et issu d'une librairie d'ADNc de cortex cérébral de rat. Il s'agit du premier récepteur aux cannabinoïdes, le RCB1 ou récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (Matsuda et al. 1990). Il est l'un des récepteurs les plus abondants dans le système nerveux central (SNC). Sa distribution a été parfaitement caractérisée chez le Rat et chez l'Homme (Glass et al. 1997; Herkenham et al. 1990; Mailleux et al. 1992; Mailleux and Vanderhaeghen 1992a; b; Tsou et al. 1998; Westlake et al. 1994). Chez ces 2 espèces, ces récepteurs sont extrêmement conservés, avec 93 % d'homologie pour leurs acides nucléiques et 97 % d'homologie pour leurs acides aminés. Le récepteur CB1 fut initialement apparenté aux récepteurs orphelins car le premier ligand endogène, l'anandamide, ne fut isolé qu'en 1992 (Devane et al. 1992). En 1993, trois ans après la découverte du récepteur CB1, un autre récepteur couplé aux protéines G et exprimé dans la lignée cellulaire humaine HL60 (cellules myélocytaires) est identifié comme étant le second récepteur aux cannabinoïdes, le RCB2 ou récepteur aux cannabinoïdes de type 2 (Munro et al. 1993). La course à la découverte du système cannabinoïde est représentée dans le Tableau 1.

Année	Découverte
1964	Isolation du delta-9-tétrahydrocannabinol (THC)
1988	Sites de liaison de haute affinité dans le cerveau pour le THC
1990-1993	Clonage des récepteurs CB1 (centraux) et CB2 (périphériques)
1992-1995	Identification de deux endocannabinoïdes (anandamide et 2-AG)
1994-1998	Rôle des endocannabinoïdes en tant que transmetteurs rétrogrades
1994	Premier antagoniste sélectif des récepteurs CB1 (rimonabant)
1999	Modèle de souris KO pour le récepteur CB1
2003	Effets métaboliques périphériques du blocage CB1
2004	Récepteurs CB2 dans les cellules neuronales et gliales
2005-2006	Publication des études cliniques "RIO" avec le rimonabant
2006-2007	Commercialisation du rimonabant (Acomplia®)
2007-2008	Développement d'autres antagonistes / agonistes / agonistes inverses des récepteurs CB1 et CB2

Tableau 1 : La course à la découverte du système cannabinoïde.

Le récepteur CB2 humain (RCB2h) ne possède qu'une faible homologie avec le récepteur CB1 humain (RCB1h), avec seulement 44% d'identité entre les acides aminés (aa).

Il existe également d'autres récepteurs aux cannabinoïdes qui ne sont ni CB1 ni CB2 et dont les plus connus sont le récepteur vanilloïde TRPV1 et le récepteur GPR55.

III. Le système cannabinoïde

Le système cannabinoïde comprend 3 grands groupes :

- **les récepteurs aux cannabinoïdes**
- **les ligands cannabinoïdes**, eux-mêmes classés en 3 familles :
 - les ligands endogènes ou endocannabinoïdes (endoCBs) qui est le terme utilisé pour désigner les lipides endogènes élaborés par l'organisme et se liant aux récepteurs aux cannabinoïdes. Les principaux endocannabinoïdes caractérisés sont l'anandamide (AEA) et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG).
 - les ligands exogènes phytocannabinoïdes (phytoCB) qui sont des composés produits par la plante. Il en existe une soixantaine dont le plus abondant et le plus actif est le tétrahydrocannabinol (Δ^9 -THC ou THC).
 - les ligands exogènes synthétiques qui sont des molécules créées chimiquement en laboratoire (Rinaldi-Carmona et al. 1994; Rinaldi-Carmona et al. 1998).
- **les enzymes** synthétisant et dégradant les endocannabinoïdes AEA et 2-AG telles que la fatty acid aminohydrolase (FAAH).

Nous détaillerons les principaux membres de cette grande famille à savoir les récepteurs aux cannabinoïdes et leurs principaux ligands, ainsi que leur mécanisme d'action.

A. Les récepteurs aux cannabinoïdes

1. Les récepteurs CB1 (RCB1)

a. Gènes et protéines

Le RCB1 est le principal médiateur des effets des CB endogènes et exogènes dans le SNC. Chez l'Homme, le gène codant pour le RCB1 est le gène *Cnr1*, situé sur le chromosome 6 (position 6q14-15) (Hoehe et al. 1991). Chez la Souris et le Rat, ce gène se situe sur le chromosome 4 (Chakrabarti et al. 1995; Valk et al. 1997).

Comme c'est souvent le cas pour les récepteurs appartenant à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires (DTM) couplés aux protéines G, les parties codantes du gène sont dépourvues d'intron. Chez l'Homme, la structure de *Cnr1* comporte 4 exons et seul le 4^{ème} code pour la protéine (Figure 2) (Zhang et al. 2004). Il existe plusieurs transcrits

différents de *Cnr1* dont 6 sont clairement identifiés et codent pour 2 isoformes du RCB1 : RCB1 et RCB1A.



Figure 2 : Structure du gène *Cnr1* humain (Zhang et al. 2004).

RCB1 reste l'isoforme principale codant pour une protéine de poids moléculaire de 64 KDa et composée de 472 aa (Figure 3) (Matsuda 1997). Cependant, du fait de la présence de plusieurs sites de glycosylation sur le récepteur, son poids moléculaire peut être variable, rendant difficile son identification précise dans des analyses biochimiques telles que le Western blot par exemple (Grimsey et al. 2008; Howlett 1995).

L'isoforme RCB1A est une protéine plus courte, composée de 411 aa et possédant 98% d'homologie avec RCB1. Cette isoforme, exprimée en quantité moindre que RCB1 dans le SNC, lie le THC et le CP55, 940 (agoniste de synthèse des RCB1) avec une faible affinité (Rinaldi-Carmona et al. 1996).

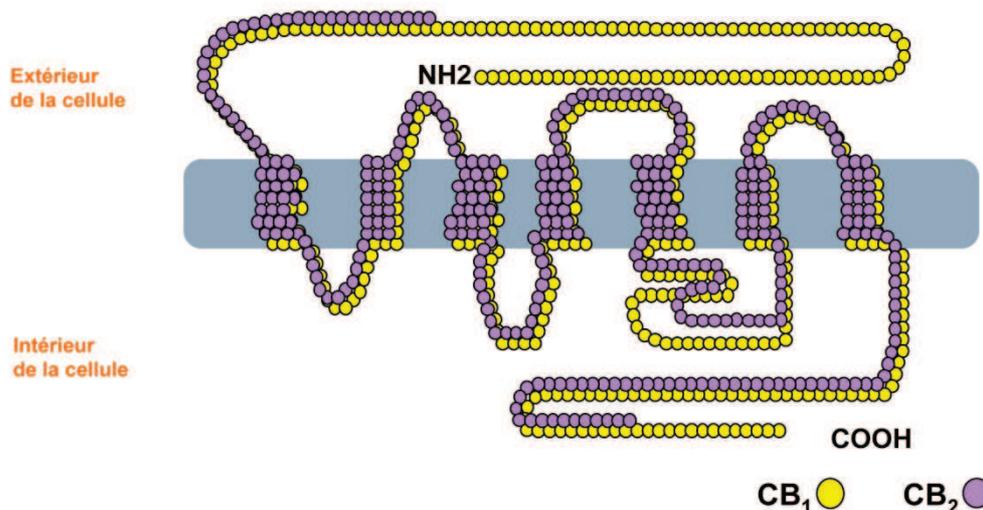


Figure 3 : Récepteurs CB1 et CB2 (Howlett 1995).

b. Distribution des RCB1

La distribution des RCB1 dans le SNC est retrouvée dans de nombreuses régions associées aux principales fonctions des cannabinoïdes qui sont la motricité, les réactions émotionnelles, la douleur, l'attention, la mémoire et la cognition.

Les données obtenues en hybridation *in situ*, en autoradiographie et en immunohistochimie ont permis de déterminer la localisation tissulaire et cellulaire des RCB1 et d'envisager ainsi

plus précisément leur rôle physiologique (Glass et al. 1997; Herkenham et al. 1990; Matsuda et al. 1993; Tsou et al. 1998). Le RCB1 est exprimé de façon ubiquitaire dans le SNC et la moëlle épinière. Une expression importante du RCB1 est retrouvée dans l'ensemble du cortex, l'hippocampe (couche moléculaire du gyrus denté, cornes d'Ammon CA1 et CA3, subiculum), les ganglions de la base, le noyau basolatéral de l'amygdale (BLA), le striatum (noyau caudé et putamen), l'hypothalamus, le noyau olfactif antérieur, le cortex cérébelleux et le mésencéphale (Aire Tegmentale Ventrale, raphé dorsal) (Figure 4). Par contre, RCB1 est quasiment absent du tronc cérébral. Le RCB1 est également retrouvé, mais en moindre quantité, dans les tissus périphériques tels que les testicules, l'utérus, l'intestin, la vessie, la rétine et le tissu adipeux (Bouaboula et al. 1993; Marsicano et al. 2002a).

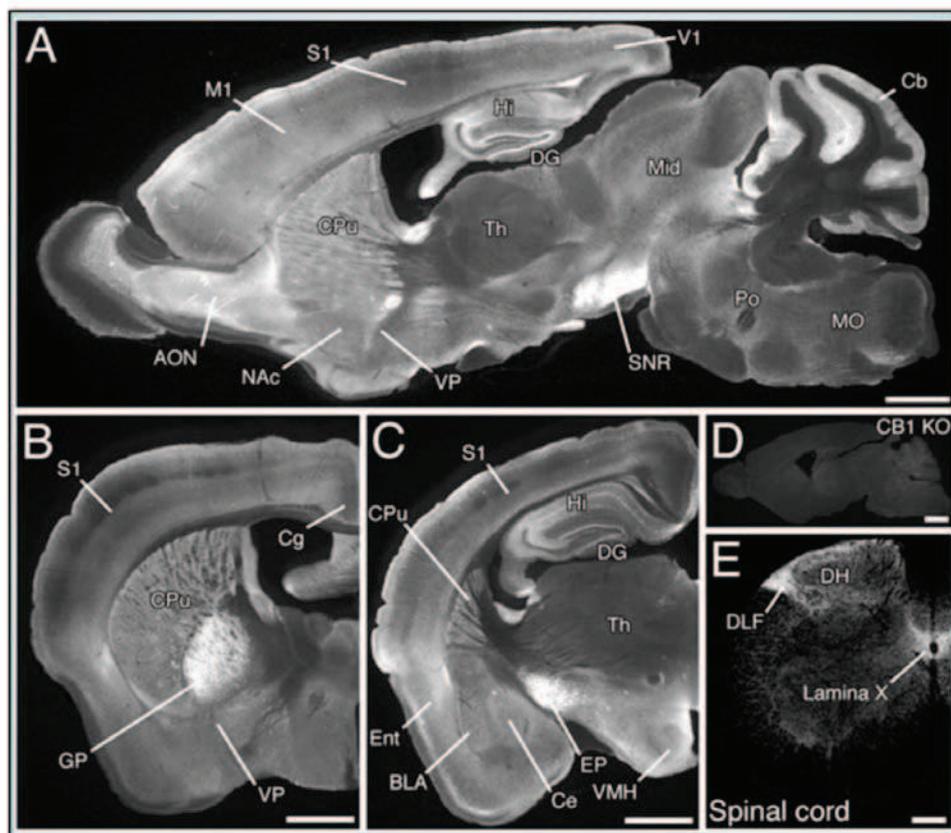


Figure 4 : Distribution du RCB1 dans le système nerveux central (A-C) et dans la moëlle épinière (E) de souris sauvage adulte et de souris mutantes délétées pour le récepteur CB1 (D) (Kano et al. 2009).

Hi : hippocampe ; BLA : noyau basolatéral de l'amygdale ; AON : noyau olfactif antérieur ; Cpu : noyau caudé putamen ; VMH : hypothalamus ventromédial ; Cb : cortex cérébelleux ; SNR : substance noire réticulée ; GP : globus pallidus ; EP : noyau entopédonculaire ; M1 : cortex somatosensoriel primaire ; S1 : cortex moteur primaire ; V1 : cortex visuel primaire ; Nac : noyau accumbens ; VP : pallidum ventral ; Th : thalamus ; Mid : mésencéphale ; Po : pons ; MO : medulla oblongata ; Cg : cortex cingulaire ; Ent : cortex entorhinal ; Ce : noyau central de l'amygdale.

A l'échelle cellulaire, après leur synthèse dans les corps cellulaires des neurones, les RCB1 sont en grande partie transportés jusqu'à leurs terminaisons axonales dans le compartiment présynaptique (Katona et al. 2001; Tsou et al. 1998). Ils sont exprimés par un grand nombre de neurones excitateurs ou inhibiteurs et sont localisés principalement dans les

terminaisons GABAergiques (essentiellement les interneurons exprimant la parvalbumine (PV) ou la cholécystokinine (CCK)) et **glutamatergiques**, avec une concentration majeure dans les synapses inhibitrices plutôt que dans les synapses excitatrices (Hohmann and Herkenham 2000; Kawamura et al. 2006; Matsuda et al. 1993; McDonald and Mascagni 2001; Tsou et al. 1999).

2. Les récepteurs CB2 (RCB2)

a. Gènes et protéines

Le gène codant pour le RCB2 est le gène *Cnr2* qui, chez l'Homme, est situé sur le chromosome 1 (1p36) (Valk et al. 1997) et, chez la Souris, sur le chromosome 4 (Chakrabarti et al. 1995; Valk et al. 1997). Chez l'homme, *Cnr2* s'étend sur 38 Kb et se compose d'au moins 2 exons, le 2^{ème} codant pour la protéine. La structure du gène *Cnr2* diffère chez le Rat puisqu'il est composé de 3 exons qui codent tous pour la protéine (Brown et al. 2002). Le transcrit code pour une protéine de 411 aa, de poids moléculaire de 46 KDa et comprenant de nombreux sites de glycosylation, à l'instar de RCB1 (Figure 3).

b. Distribution des RCB2

Les RCB2 sont principalement exprimés dans les cellules du système immunitaire (lymphocytes T, lymphocytes B, lymphocytes Natural Killer, monocytes) (Lee et al. 2001) et dans les tissus du système lymphoïde (rate, thymus, moëlle osseuse, amygdale). La fonction principale du RCB2 est de contrôler la libération des cytokines, protéines impliquées dans les réactions inflammatoires et la régulation du système immunitaire.

Les RCB2 sont également nombreux dans le pancréas, le muscle squelettique et l'épiderme (Munro et al. 1993). Plus récemment, leur présence a été identifiée dans le SNC, dans les cellules de la microglie (Ashton et al. 2006) et également dans les neurones (Gong et al. 2006; Katona et al. 2006; Morgan et al. 2009) mais en quantité nettement moindre que les RCB1.

3. Voies de signalisation intracellulaires

Les RCB1 et RCB2 font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G de type Gi/Go sensibles à la toxine pertussique. L'activation de ces récepteurs agit principalement sur plusieurs voies de signalisation intracellulaire : l'adénylate cyclase et la voie des Mitogen Activated Protein Kinases (MAP Kinases) (Figure 5). Ils contrôlent également la perméabilité de certains canaux ioniques.

a. Inhibition de l'adénylate cyclase

Cette voie a été découverte en 1984 par Howlett et ses collaborateurs, avant l'identification et le clonage des récepteurs aux cannabinoïdes (Howlett and Fleming 1984). Ils avaient trouvé que les cannabinoïdes inhibaient la production d'AMPc de façon réversible et dose-dépendante et que cet effet était bloqué par la toxine pertussique, impliquant ainsi les protéines Gi et Go dans la transduction du signal. Le clonage des récepteurs CB1 et CB2 a

permis de confirmer cette découverte et il est apparu un couplage différent des RCB1 et RCB2 à la protéine G : RCB1 se couplerait aux protéines Gi et Go tandis que RCB2 se couplerait préférentiellement à Go (Glass and Northup 1999). Par ce couplage différent aux protéines G, l'activation des récepteurs induit soit un signal inhibiteur, soit un signal activateur (Figure 5).

b. Activation de la voie des MAP Kinases

Indépendamment de l'AMPC mais toujours à travers un couplage Gi/o, les récepteurs CB1 et CB2 activent de façon dose-dépendante d'autres voies de signalisation telles que les MAP Kinases qui jouent un rôle fondamental dans le contrôle de la viabilité ou de la mort cellulaire, en particulier au cours des processus de prolifération et de croissance tumorale (Fukunaga and Miyamoto 1998). Les cannabinoïdes sont capables d'activer plusieurs membres de la famille des MAP Kinases (Figure 5) :

- ERK1/2 (extracellular signal related protein kinase), protéine impliquée dans la régulation et l'expression de gènes ainsi que dans la synthèse protéique (Bouaboula et al. 1995a; Bouaboula et al. 1995b; Bouaboula et al. 1996).
- Jun Kinase (JNK) et P38 Kinase, protéines impliquées dans la régulation de l'expression des gènes et dans la mort cellulaire par apoptose (Derkinderen et al. 2003; Downer et al. 2003).
- Protéine kinase B (PKB ou Akt), impliquée dans la survie cellulaire (Gomez et al. 2011)
- NFkB (nuclear factor kappa B) impliquée dans les phénomènes d'inflammation (Luttrell et al. 1999).

L'activation de la voie des MAP kinases va déclencher une cascade de phosphorylations aboutissant à l'activation de multiples facteurs de transcription tels que krox 24, c-fos ou c-jun (Bouaboula et al. 1995b; Derkinderen et al. 2003). Cette activation peut également engendrer celle de la synthèse de céramide, second messenger ubiquitaire qui joue un rôle dans le métabolisme, la différenciation, la survie et la mort cellulaire (Galve-Roperh et al. 1998). Cette voie de signalisation est encore assez mal connue mais impliquerait l'activation directe d'une kinase qui phosphorylerait Raf1.

c. Contrôle de la perméabilité de certains canaux ioniques

L'activation des RCB1 par les cannabinoïdes endogènes ou exogènes (tels que le WIN55,212-2, le CP55,940 et le THC) modulent (Figure 5) :

- les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants de type N, L et Q/P, localisés dans les neurones présynaptiques, comme les RCB1
- les canaux K^+ rectifiés entrants couplés aux protéines G (Henry and Chavkin 1995)
- les canaux K^+ de type A sensibles au potentiel membranaire

La modulation de la fonction des canaux ioniques par les cannabinoïdes régule **la transmission synaptique**, phénomène que nous détaillerons dans le prochain chapitre.

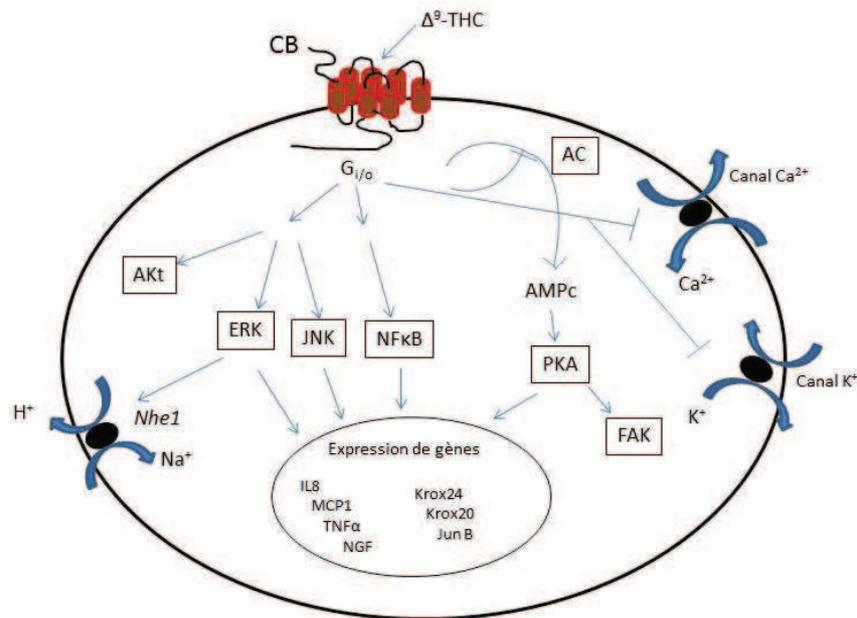


Figure 5 : Les différentes voies de la signalisation intracellulaire.

AC : Adénylate cyclase ; AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique ; Akt : ERK : Extracellular Related protein Kinase ; JNK : Jun Kinase ; NfκB : Nuclear Factor Kappa B ; PKA : Protéine kinase A ; FAK : Focal Adhesion Kinase.

4. Les autres récepteurs aux cannabinoïdes

L'utilisation de souris transgéniques invalidées pour les gènes *Cnr1* et *Cnr2* a permis de mettre en évidence que les effets biologiques des cannabinoïdes étaient majoritairement, mais non exclusivement liés à l'activation des RCB1 et RCB2.

En effet, il existe d'autres récepteurs aux cannabinoïdes. Nous n'aborderons que le récepteur vanilloïde TRPV1 et le récepteur GRP55, qui sont les plus connus. Néanmoins, leur rôle dans la signalisation endoCB reste de nos jours encore méconnue.

a. Le récepteur vanilloïde

Il s'agit du récepteur de la capsaïcine, responsable de la sensation de chaleur provoquée par le piment. Ce récepteur-canal, abondant dans les terminaisons nerveuses périphériques et centrales des neurones sensoriels, est aussi appelé TRPV1 et s'ouvre lors d'un stimulus chimique nociceptif ou thermique supérieur à 45°C.

L'anandamide est un agoniste de ce récepteur et provoque en l'activant des effets tels que la vasodilatation endothélium-indépendante des artérioles et l'induction de l'apoptose de cellules de lymphomes et de neuroblastomes (Zygmunt et al. 1999). La capsazépine, antagoniste des récepteurs TRPV1, bloque ces effets.

b. Le récepteur GRP55

Ce récepteur couplé aux protéines G est resté orphelin jusqu'à la découverte en 2007 de ses ligands dont les principaux sont l'anandamide, le cannabidiol et la virodhamine. Ce récepteur

est exprimé dans l'intestin, les glandes surrénales et le SNC. Son rôle dans les neuropathies a été mis en évidence dans un modèle de souris transgéniques invalidées pour le récepteur GRP55^{-/-} et résistantes à la douleur (Staton et al. 2008).

B. Les endocannabinoïdes

Très vite après la découverte des RCB1 et RCB2, deux de leurs ligands endogènes ont été identifiés : l'**arachidonoyl éthanamide (AEA)**, baptisé **anandamide** et le **2-arachidonoylglycérol (2-AG)** (Devane et al. 1992; Mechoulam et al. 1995). Depuis, de nombreux autres agonistes endogènes ont été identifiés parmi lesquels le palmitoylethanolamide, l'oleoylethanolamide, la N-arachidonyle dopamine, le noladin et la virodhamine (Hanus et al. 2001).

Par leur nature lipidique, ces neurotransmetteurs à part entière ne sont pas stockés dans des vésicules synaptiques mais **sont synthétisés** dans la membrane du neurone postsynaptique « **à la demande** », après une excitation de la terminaison nerveuse par un potentiel d'action. Ces cannabinoïdes endogènes se lient aux récepteurs CB1 localisés sur les terminaisons présynaptiques. Nous ne détaillerons que les 2 ligands principaux : l'AEA et le 2-AG.

1. L' anandamide

L'anandamide a été identifié dans le cerveau de porc en 1992 (Devane et al. 1992). Ce composé endogène existe en grande quantité dans le SNC et les plus hauts niveaux d'expression correspondent aux régions dans lesquelles le RCB1 est majoritairement exprimé (hippocampe, striatum, cervelet et cortex) (Di Marzo et al. 1994).

Il est synthétisé dans le neurone postsynaptique à partir d'un précurseur phospholipidique, le phosphatidylethanolamine (PE), qui réside dans la membrane du neurone (Figure 6). En présence d'un excès de calcium ou d'AMPc dans le neurone postsynaptique, l'enzyme N-acyl transférase (NAT) va transférer un acide arachidonique sur l'éthanolamine de la phosphatidylethanolamine (PE), conduisant au N-arachidonoyl PE (NAPE). Ce dernier sera clivé et libérera, par un mécanisme dépendant de la présence de Ca²⁺, l'anandamide et un acide phosphorique par l'action d'une phospholipase D, activée par la dépolarisation ou la stimulation d'un récepteur couplé à une protéine G (Figure 6) (Di Tomaso et al. 1997; Piomelli et al. 1998). L'anandamide est donc constitué d'un acide arachidonique lié à l'éthanolamine par une liaison amide.

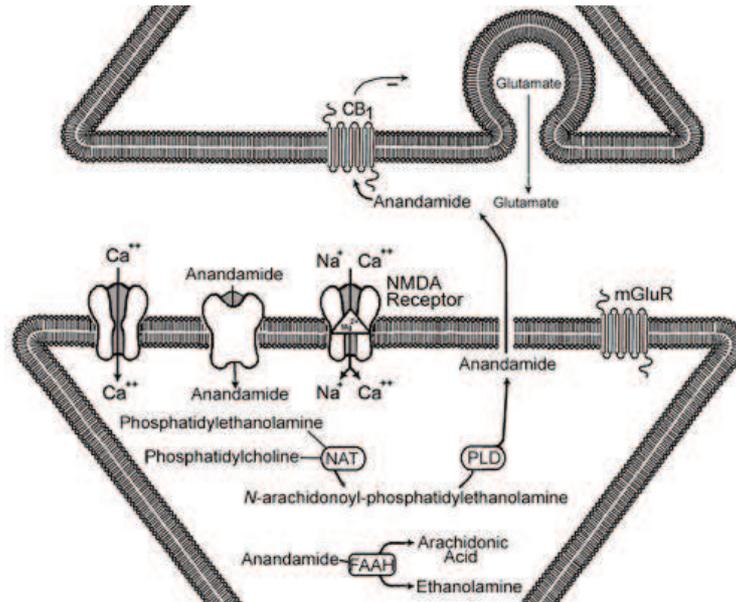


Figure 6 : Synthèse et dégradation de l'anandamide.

FAAH : fatty acid amide hydrolase ; mGluR : metabotropic glutamate receptor ; NAPE : N-arachidonoyl-phosphatidylethanolamine ; NAT : N-acyltransferase ; NMDA : N-méthyl-D-aspartic acid et PLD : phospholipase D (Hohmann 2006).

Une fois libéré dans la synapse, l'anandamide agit de façon **rétrograde** sur les RCB1 localisés sur les neurones présynaptiques afin de réguler la libération de neurotransmetteurs (Figure 6). L'anandamide est un agoniste total des RCB1 ($K_i = 72 \text{ nM}$) mais se lie également aux RCB2, aux TRPV1 et aux GPR55 avec une plus faible affinité ($K_i \text{ RCB2} = 279 \text{ nM}$). Son action peut être postsynaptique afin de réguler l'excitabilité et la plasticité synaptique par la modulation des canaux K^+ ou par la régulation de protéines kinases.

La dégradation de l'anandamide se déroule selon 2 étapes (Figure 6). Tout d'abord (1) le ligand traverse via un transporteur spécifique (Piomelli et al. 1998) la membrane du neurone postsynaptique dans lequel il sera (2) internalisé et hydrolysé par la Fatty Acid Amid Hydrolase (FAAH) en éthanolamine et acide arachidonique (Egertova et al. 1998). L'enzyme FAAH est une protéine intracellulaire liée à la membrane et est exprimée avec des niveaux élevés dans les corps cellulaires et les dendrites des neurones (Piomelli 2003).

2. Le 2-arachidonylglycérol (2-AG)

Le 2-AG est un dérivé du phosphatidylinositol (PI) constitué d'une molécule d'acide arachidonique liée à un glycérol par une liaison ester.

Le 2-AG est un ligand total des RCB1 et RCB2, avec des constantes d'inhibition respectives de 58 nM et 145 nM (Sugiura et al. 2006) et est présent en plus grande quantité que l'anandamide dans le SNC.

La synthèse du 2-AG s'effectue dans le neurone postsynaptique où elle est déclenchée par la dépolarisation postsynaptique et l'influx de Ca^{2+} dans le neurone suite à l'activation des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants. Elle s'effectue selon 2 voies de synthèse (Figure 7).

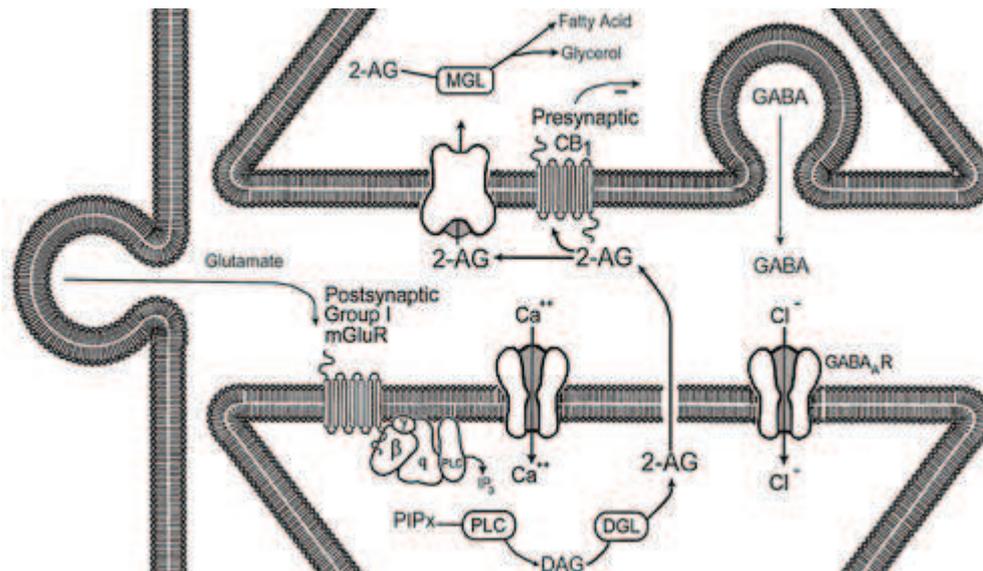


Figure 7 : Synthèse et dégradation du 2-AG.

DAG : diacylglycérol ; DGL : diacylglycérol lipase ; GABA : acide γ -aminobutyrique ; MGL : monoacylglycérol lipase ; mGluR : métabotrope glutamate récepteur ; PLC : phospholipase C et PIPx : phospholipid precursors (Hohmann 2006).

La première voie de synthèse implique la transformation de phospholipides membranaires contenant de l'acide arachidonique tel que le PI en 1,2-diacylglycérol (DAG), sous l'action d'une phospholipase C (PLC) spécifique, engagée par l'activation de divers récepteurs métabotrope du groupe I (mGluR1 et mGluR5). L'hydrolyse du DAG par l'enzyme DAG-lipase libèrera le 2-AG (Farooqui et al. 1989; Piomelli 2003; Stella et al. 1997). Aussi, le clivage sous l'action de la phospholipase A1 (PLA1) du 2-arachidonoyl-lysophospholipide (Lyso-PI), qui sera ensuite hydrolysé par la lyso-PLC, et libèrera la molécule de 2-AG (Higgs and Glomset 1994).

La dégradation du 2-AG implique la catalyse par la monoacylglycérol lipase (MGL) en glycérol et acide arachidonique (Dinh et al. 2002). La MGL est présente dans les terminaisons présynaptiques (Figure 7).

C. Les phytocannabinoïdes

Les phytocannabinoïdes sont les ligands naturels dérivés du cannabis. Plus de 60 ont été caractérisés et leur concentration varie en fonction des plantes, des régions et du climat. Les concentrations les plus importantes regroupent le Δ^9 -THC, le cannabidiol, le Δ^8 -THC, le cannabinoïle et le cannabigérol. Parmi ces substances, le Δ^9 -THC est celui qui concentre l'essentiel des **activités psychotropes** (Figure 8). Le Δ^9 -THC, comme bon nombre de ses métabolites, est un composé très lipophile, très peu hydrophile, thermolabile et photolabile (Garrett and Hunt 1974).

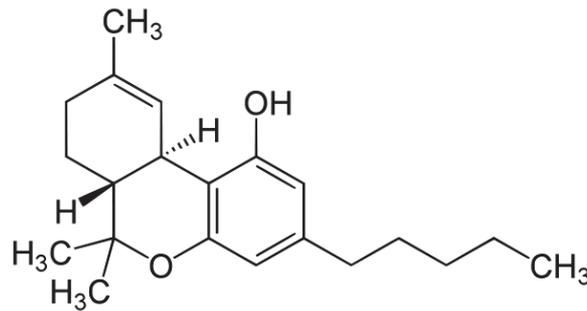


Figure 8 : Structure chimique du Δ9-TétraHydroCannabinol (Δ9-THC ou THC).

1. Pharmacocinétique du Δ9-THC

a. Absorption

L'absorption du THC va dépendre de son mode de consommation, selon qu'il est inhalé ou ingéré. L'inhalation reste le mode de consommation le plus fréquent.

L'absorption par inhalation de la fumée issue de la combustion du THC, est extrêmement rapide avec une biodisponibilité de 15 % à 50 % (Pelissier et al. 1997). Le THC gagne les alvéoles pulmonaires pour franchir la membrane alvéolo-capillaire et atteindre très rapidement le sang : deux minutes après l'inhalation, la molécule y est déjà détectable. Sa concentration plasmatique atteint, quand à elle, un pic après environ 7 minutes (Huestis et al. 1992a). La demi-vie du THC est brève, environ 10 minutes. Les effets psychotropes arrivent après 15 à 30 minutes (Goulle et al. 2008).

Si le THC est ingéré, l'absorption est beaucoup plus lente et erratique avec une biodisponibilité de 4 à 12 %. Sa concentration plasmatique atteint un pic entre 60 et 120 minutes, avec des effets débutant après 30 à 90 minutes et se maintenant de 4 à 12 heures (Goulle et al. 2008).

b. Distribution tissulaire

Dans le sang, environ 90 % du THC se concentre dans le plasma, contre 10 % dans les hématies, et environ 97 % du THC plasmatique se lie aux lipoprotéines (Giroud et al. 2001).

L'importante **lipophilie** des cannabinoïdes entraîne une **pénétration rapide dans les tissus riches en lipides** (Charalambous et al. 1991) et fortement vascularisés parmi lesquels le cerveau, que le THC cible de façon privilégiée. La solubilisation du THC dans les lipides lui assure une libération continue au sein du SNC et la présence sur le long terme de concentrations toujours actives. Ceci sera à l'origine de la longueur de ses effets psychoactifs. Le THC se stocke également dans les tissus musculaires et gras. Des cannabinoïdes ont été mis en évidence dans les biopsies de tissu adipeux 4 semaines après la dernière consommation de cannabis (Johansson et al. 1989).

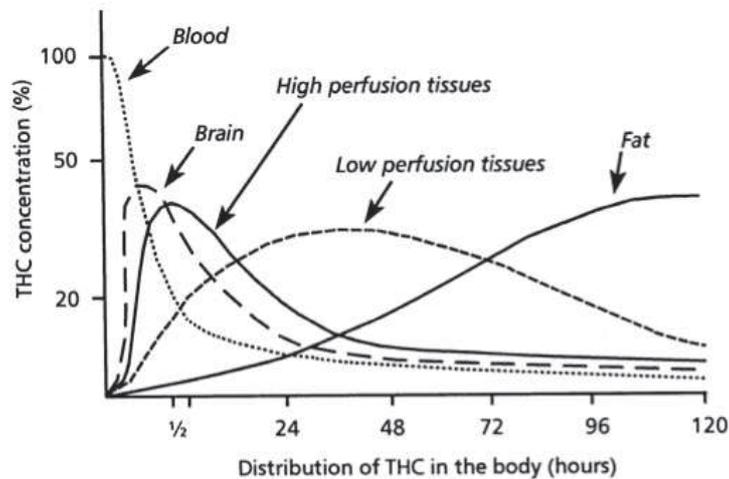


Figure 9 : Pharmacocinétique du THC après inhalation (Nahas 2001).

La distribution rapide du THC explique sa courte demi-vie qui n'est pas due à son élimination mais à son stockage dans l'organisme (Figure 9). Soixante minutes après le début de l'inhalation d'une cigarette de cannabis contenant 1,75 % de THC, la concentration sanguine devient inférieure à 10 ng/l (Huestis and Cone 2004). Les taux de THC dans le sang diminuent puis disparaissent tandis que ceux dans le SNC apparaissent et augmentent : les effets centraux se développent et culminent après environ une vingtaine de minutes, perdurant sur des temps très différents, de façon dose-dépendante. Ainsi, les effets ébriants du THC durent environ 4 heures, les troubles de la vigilance sont de l'ordre de 8 heures et les perturbations de la cognition peuvent s'étendre sur plusieurs jours (Voir chapitre IV). De même, le THC est capable de traverser la barrière foeto-placentaire et de gagner la circulation foetale aussi rapidement que dans le sang maternel (Bailey et al. 1987). Le THC se retrouve aussi dans le lait au moment de la lactation (Behnke and Eylar 1993).

c. Métabolisme.

Le métabolisme des cannabinoïdes est complexe. Plus de 100 métabolites ont été identifiés pour le THC (Cone et al. 1993; Harvey and Brown 1991; Huestis et al. 1992a) mais nous n'aborderons que les principaux. A la suite de son métabolisme oxydatif dans les microsomes hépatiques, le THC donne naissance à :

- **du 11-OH- Δ^9 -THC** métabolite actif majeur, issu de l'hydroxylation microsomiale par le cytochrome P450 (CYP 2C9) (Harvey 1990; Harvey and Brown 1991). Il participe à la potentialisation des effets du cannabis. Vingt minutes après l'inhalation, les concentrations plasmatiques sont de 4 à 20 ng/ml (Huestis and Cone 2004; Huestis et al. 1992a) et après 4h, il reste moins de 1 ng/ml dans le sang (Figure 10). Le transporteur principal de ce métabolite est l'albumine qui permet une pénétration beaucoup plus importante dans le SNC comparativement au Δ^9 -THC dont les transporteurs sont principalement des lipoprotéines, molécules plus grosses (Schou et al. 1977). Le **11-OH- Δ^9 -THC** est ensuite oxydé en **11-nor-9-carboxy- Δ^9 -THC (Δ^9 -THC-COOH)** qui est sans activité pharmacologique (Huestis et al. 1992b). Lorsque le

cannabis est ingéré, la quasi-totalité du Δ^9 -THC est hydroxylée en **11-OH- Δ^9 -THC** dans la muqueuse intestinale (Law et al. 1984a).

- **du 8- β -hydroxy- Δ^9 -THC**, dont la participation aux effets du cannabis est négligeable car il est rapidement métabolisé
- **du 8- β ,11-dihydroxy- Δ^9 -THC** et **du 8- α -hydroxy- Δ^9 -THC**, métabolites mineurs non psychoactifs.

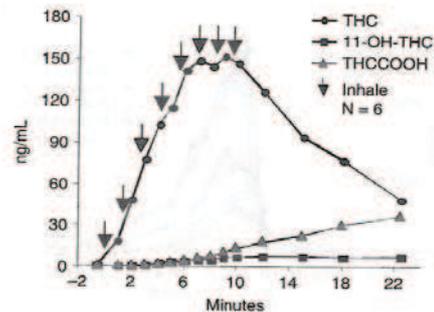


Figure 10 : Concentrations plasmatiques de Δ^9 -THC, de 11-OH- Δ^9 -THC et de Δ^9 -THC-COOH en fonction du temps après inhalation d'une cigarette de cannabis contenant 3,55 % de Δ^9 -THC (Garrett 1978).

d. Élimination/Excrétion

L'élimination du THC est lente, quel que soit son mode de consommation. Elle s'effectue principalement par voie fécale (60 à 85 % du THC), sous forme de 11-OH- Δ^9 -THC et de Δ^9 -THC-COOH, et par voie urinaire (20-35 %) sous forme de Δ^9 -THC-COOH (Wall et al. 1983) (Figure 11). Après une dose unique de THC, la recherche urinaire de Δ^9 -THC-COOH reste positive pendant 3 à 12 jours (Huestis and Cone 1998; Law et al. 1984a; Law et al. 1984b). Chez des consommateurs réguliers, le Δ^9 -THC-COOH se détecte encore 27 jours après l'arrêt de la consommation (Smith-Kielland et al. 1999). Il a aussi été rapporté que chez les très grands consommateurs, le dépistage urinaire reste positif jusqu'à 95 jours après l'arrêt (Ellis et al. 1985; Kielland 1992).

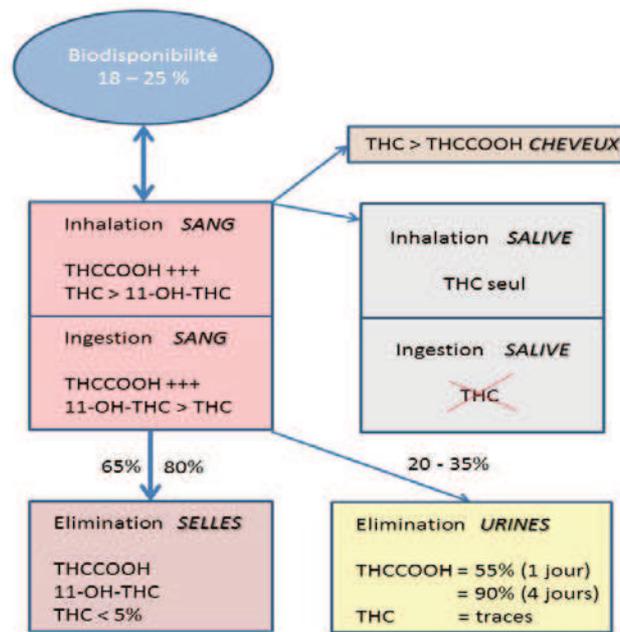


Figure 11 : Concentrations des principaux métabolites du Δ^9 -THC dans les différentes voies d'élimination et milieux biologiques (Goulle and Lacroix 2006).

2. Dosage du THC et dépistage

La connaissance des différentes voies d'élimination du THC a permis d'élaborer différentes méthodes de dosage du composé et de ses dérivés métaboliques afin de dépister une éventuelle consommation de cannabis.

- **Le dépistage urinaire** est la méthode la plus appropriée et la plus rapide pour déceler une consommation de cannabis. C'est la concentration urinaire en THC-COOH qui est analysée. Elle peut se situer entre 50 et 500 ng/ml et atteindre plusieurs milliers de ng/ml, selon le type de consommateur (Meatherall and Warren 1993).
- **Le dépistage salivaire** est basé sur la séquestration bucco-dentaire du THC qui s'opère lors de son inhalation (Kintz et al. 2000). Les concentrations salivaires sont importantes dans les minutes après l'inhalation, elles déclinent rapidement dans les heures qui suivent mais restent détectables environ pendant 4 à 6h après l'inhalation (Maseda et al. 1986).
- **L'analyse du sang** est actuellement le seul protocole permettant une estimation du temps écoulé entre la dernière consommation et le moment du prélèvement (Huestis et al. 1992c). Elle permet de différencier les principes actifs et les métabolites pour une analyse quantitative.
- **L'analyse de cheveux** peut permettre de connaître la chronicité et le niveau (faible, moyen, important) de consommation (Klein et al. 2000), ce qui peut être utile en médecine légale, médecine du travail ou dans le cadre de la lutte antidopage (Uhl 1997).

D. Les cannabinoïdes synthétiques

Ce sont des molécules chimiques dont l'élaboration est basée sur la structure des endocannabinoïdes et du Δ^9 -THC. Ils sont répertoriés selon différentes classes de famille : les cannabinoïdes sélectifs, les cannabinoïdes non classiques, les amyloalkylindoles et les dérivés pyrazols.

1. Les cannabinoïdes sélectifs

La modification de la structure de l'AEA qui présente une plus grande affinité pour le RCB1 par rapport au RCB2 a conduit à la synthèse d'agonistes sélectifs du RCB1 (Howlett et al. 2002). Parmi ces composés, on retrouve la méthanandamide, l'arachidonyl-2'chloroéthylamide (ACEA), l'arachidonylcyclopropylamide (ACPA) et l'O-1812. Quant aux ligands sélectifs du RCB2, on retrouve principalement le JWH133 et le JWH015 (Tableau 2).

2. Les cannabinoïdes non classiques

Ils dérivent de la structure du Δ^9 -THC parmi lesquels le CP55, 940 et le HU-210 (Figure 12). Le CP55, 940 est l'un des agonistes complets le plus souvent utilisé en laboratoire (Howlett et al. 2002). Il produit des effets pharmacologiques similaires au THC et présente une très forte affinité pour les RCB1 et une affinité moindre pour les RCB2 (Tableau 2). Il se montre aussi plus sélectif que le THC sur ces récepteurs. Nous avons utilisé cet agoniste dans nos travaux de recherche.

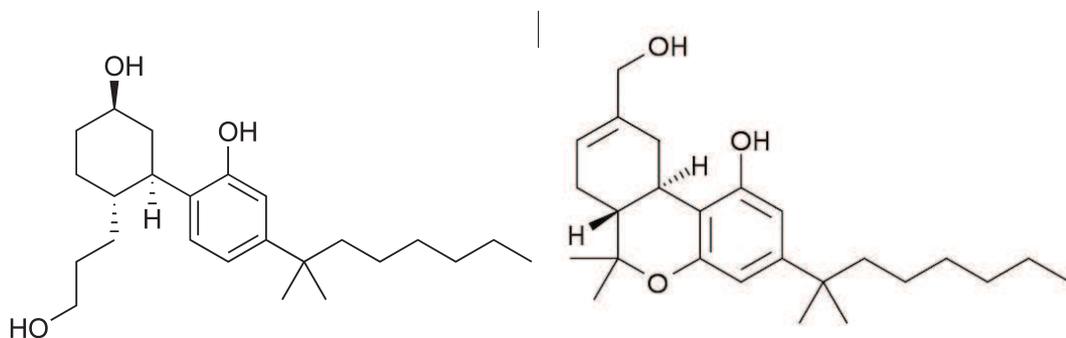


Figure 12 : Structure chimique du CP55, 940 (à gauche) et du HU-210 (à droite).

3. Les amyloalkylindoles

Le plus connu de cette classe est le WIN55, 212-2 (Figure 13). C'est un agoniste complet qui possède une haute affinité pour les RCB1 et RCB2 (Tableau 2). Néanmoins il se montre plus sélectif pour les RCB2.

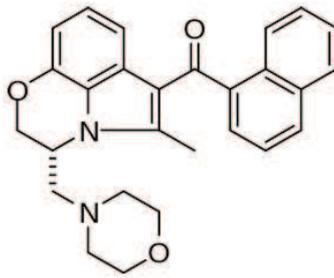


Figure 13 : Structure chimique du WIN55, 212-2.

4. Les dérivés pyrazols

Ce sont des antagonistes ou des agonistes inverses, tels que le SR141716A et le SR144528, produits synthétisés par les laboratoires Sanofi Aventis.

Le SR141716A, connu sous le nom de Rimonabant, est un antagoniste sélectif des RCB1, initialement commercialisé sous le nom d'Acomplia® pour le traitement de l'obésité. Des études précliniques avaient également suggéré une activité thérapeutique potentielle de ce produit dans le sevrage tabagique ou l'addiction au cannabis. En Novembre 2008, le produit a été retiré du marché pour ses effets secondaires psychiques trop importants (sévères troubles de l'humeur et dépression).

Le SR144528 est un antagoniste sélectif des RCB2 (Rinaldi-Carmona et al. 1994; Rinaldi-Carmona et al. 1998). L'AM251 et l'AM281 sont également des antagonistes du RCB1. L'AM630 est un antagoniste des RCB2.

Le Tableau 2 représente les différentes affinités des agonistes et des antagonistes pour les RCB1 et RCB2.

<i>Ligand</i>	<i>CB1 - Ki value (nM)</i>	<i>CB2 - Ki value (nM)</i>
CB1-selective agonists		
ACEA	1,4 - 5,29	195 - > 2000
O-1812	3,4	3870
ACPA	2,2	715
2-arachidonylglyceryl ether (noladin ether)	21,2	> 3000
R-(+)-methanandamide	17,9 to 28,3	815 to 868
Agonists without significant CB1 or CB2-selectivity		
HU-210	0,06 to 0,73	0,17 to 0,52
CP55940	0,5 to 5,0	0,69 to 2,8
R-(+)-WIN55212	1,89 to 123	0,28 to 16,2
Nabilone	1,84	2,19
(-)- Δ^9 -THC	5,05 to 80,3	3,13 to 75,3
(-)- Δ^8 -THC	44 - 47,6	39,3 - 44
Anandamide	61 to 543	279 to 1940
2-arachidonoylglycerol	58,3 - 472	145 - 1400
CB2-selective agonists		
AM1241	280	3,4
JWH-133	677	3,4
L-759633	1043 - 15850	6,4 - 20
L-759656	529 to > 20 000	11,8 to 57
JWH-015	383	13,8
HU-308	> 10 000	22,7
CB1-selective antagonists / inverse agonists		
SR141716A	1,8 to 12,3	514 to 13 200
AM281	12	4200
AM251	7,49	2290
CB2-selective antagonists / inverse agonists		
SR144258	50,3 to > 10 000	0,28 to 5,6
AM630	5152	31,2

Tableau 2 : Affinités comparées des différents agonistes et antagonistes des RCB1 et RCB2 (Lopez-Moreno et al. 2008).

Chapitre II Endocannabinoïdes, développement et plasticité synaptique

I. Endocannabinoïdes et développement

Le système endocannabinoïde est présent dès les phases précoces du développement (stade prénatal embryonnaire et postnatal précoce) mais également durant l'adolescence, ce qui lui confère un rôle fondamental dans les processus clés du développement neuronal.

A. Les endocannabinoïdes au stade prénatal et postnatal précoce

Les RCB1 sont présents et fonctionnels dès le 11^{ème} jour embryonnaire chez le Rat et dès la 14^{ème} semaine embryonnaire chez l'Homme (Biegon and Kerman 2001; Buckley et al. 1998). Chez l'Homme, une augmentation progressive de la densité des RCB1 est observée entre la période fœtale (19 semaines de gestation) et l'âge adulte dans les couches corticales, la région CA1 de l'hippocampe, les ganglions de la base et le cortex cérébelleux (Mato et al. 2003). Chez le Rat, l'expression des RCB1 augmente entre le 16^{ème} jour embryonnaire et l'âge adulte dans des régions homologues (Rodriguez de Fonseca et al. 1993). Chez le Rat comme chez l'Homme, un aspect important concernant la présence des RCB1 dans le SNC en développement est l'apparition transitoire des RCB1 sur les fibres neuronales de la substance blanche pendant la période embryonnaire et leur disparition à l'âge adulte. En effet, chez l'Homme, de fortes densités de RCB1 sont observées sur le tractus pyramidal, les pédoncules cérébelleux supérieurs (réunissant le cervelet au mésencéphale), la capsule interne et la région subventriculaire (zone proliférative) (Mato et al. 2003) et chez le Rat, sur la commissure antérieure, le corps calleux, le fornix, la fimbria, la strie médullaire, la strie terminale et le faisceau rétroflexe (Berrendero et al. 1999; Fernandez-Ruiz et al. 2000; Fernandez-Ruiz et al. 2004; Romero et al. 1997). Cet effet, chez le Rat, est maximal au 21^{ème} jour embryonnaire puis diminuera progressivement du 1^{er} au 5^{ème} jour postnatal (JPN) pour finalement disparaître dans le cerveau adulte. En accord avec ces données, il a été suggéré que la localisation atypique des RCB1 dans la matière blanche pourrait provenir soit de leur présence sur les axones en migration pour établir des contacts synaptiques, soit de leur présence sur des cellules non neuronales (astrocytes, oligodendrocytes) qui accompagnent la migration neuronale ou l'élongation axonale.

La figure 14 représente les densités de marquage obtenues par autoradiographie et hybridation *in situ* dans des cerveaux de rat à différentes périodes de l'ontogénèse (21^{ème} jour de gestation, 1^{er} jour postnatal, 5^{ème} jour postnatal et à l'âge adulte) (Romero et al. 1997).

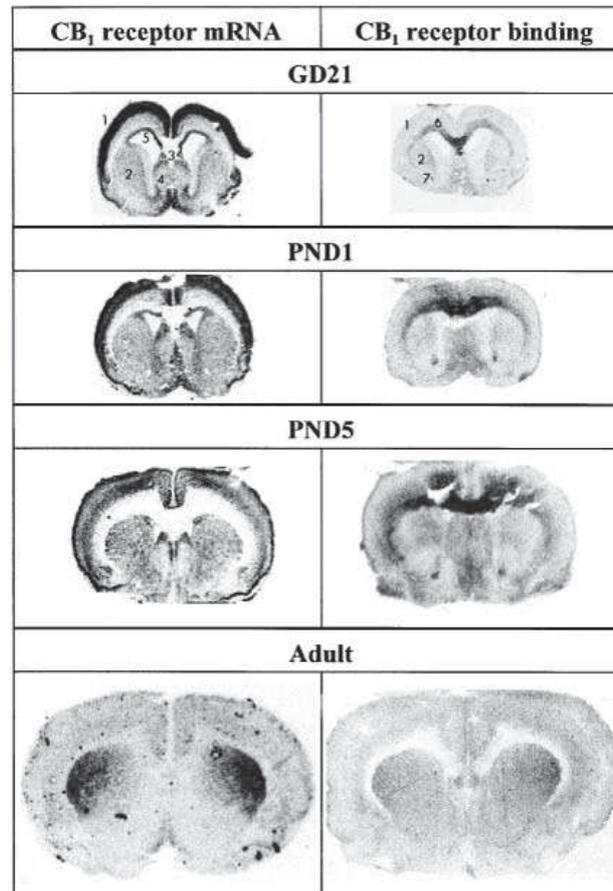


Figure 14: Autoradiographie et hybridation *in situ* dans des cerveaux de foetus de rat au 21^{ème} jour de gestation (JG21), 1^{er} jour postnatal (JPN1), 5^{ème} jour postnatal (JPN5) et à l'âge adulte. 1: cortex cérébral ; 2: caudé-putamen ; 3: noyaux du septum ; 4: bande diagonale ; 5: zone subventriculaire ; 6: corps calleux ; 7: commissure antérieure (Romero et al. 1997).

La quantification des ligands endogènes montre que le 2-AG, l'anandamide et son précurseur le NAPE sont présents dès le 21^{ème} jour embryonnaire chez le Rat. Les concentrations en 2-AG sont 1000 fois plus fortes que celles en anandamide et restent constantes du 21^{ème} jour embryonnaire à l'âge adulte, à l'exception d'un pic uniquement au 1^{er} JPN (Berrendero et al. 1999). A l'inverse, les concentrations en anandamide et en NAPE augmentent progressivement à partir du 21^{ème} jour embryonnaire jusqu'à atteindre leur taux maximum à l'âge adulte (Berrendero et al. 1999).

Le système endoCB interviendrait dans **la régulation de la maturation structurale et fonctionnelle du SNC**. Des études récentes confirment cette hypothèse en montrant le rôle fondamental des endoCB et des RCB1 dans des processus clés du développement neuronal tels que la **neurogenèse, la formation gliale, la migration neuronale, l'élongation axonale et la fasciculation** (Figure 15) (Berghuis et al. 2007; Harkany et al. 2007; Mulder et al. 2008). En effet, les endoCB permettent **la survie et la différenciation des cellules progénitrices** neuronales en cellules gliales (Aguado et al. 2006; Guzman et al. 2002). Ils interagissent également avec d'autres systèmes de signalisation, tels que les neurotrophines (Berghuis et al. 2005), les facteurs de croissance (Preet et al. 2008) et les cytokines pro-inflammatoires

(Rajesh et al. 2008) pour réguler la **migration neuronale**. Song et Zhong ont rapporté que les ligands exogènes des RCB1 (AEA, HU210, WIN5512-2) provoquent la migration de cellules HEK (Human Embryonic Kidney) préalablement transfectées avec des RCB1 (Song and Zhong 2000) et Berghuis et al. démontrent que l'AEA et le WIN5512-2, en coopération avec le facteur neurotrophique BDNF, provoquent la migration d'interneurones GABAergiques (Berghuis et al. 2005). Le rôle du RCB1 dans le **guidage axonal et dans la synaptogénèse** est également démontré dans des cultures d'interneurones GABAergiques embryonnaires où l'activation du récepteur par un agoniste provoque un effondrement du cône de croissance et la répulsion des neurites (Berghuis et al. 2007). Par ailleurs, les agonistes des RCB1 inhibent la formation de synapses dans des cultures de neurones hippocampiques (Kim and Thayer 2001) et provoquent la rétraction des neurites de neurones corticaux glutamatergiques (Vitalis et al. 2008). Les mécanismes moléculaires régulant ces actions restent à être élucidés.

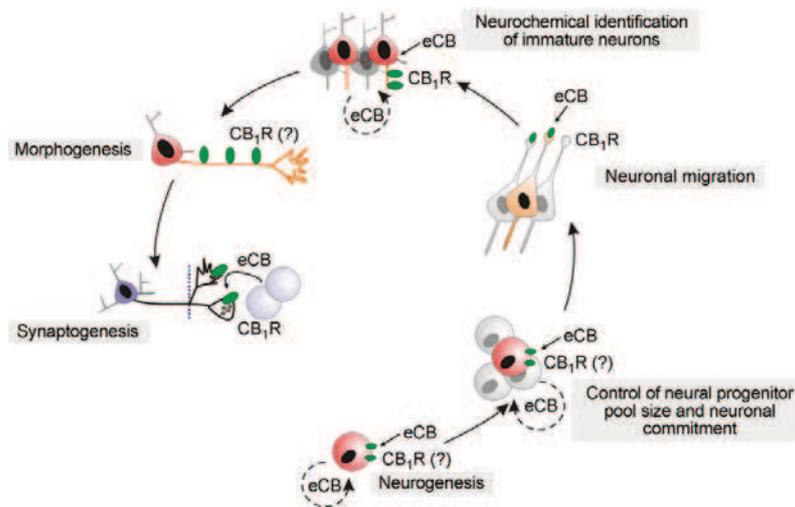


Figure 15 : Rôle du système endoCB lors du développement du SNC (Harkany et al. 2008).

Le système endoCB **influence également l'expression de gènes impliqués dans le développement neuronal**, notamment les gènes codant pour la tyrosine hydroxylase, la proenkephaline, la molécule d'adhésion neuronale L1 et le système BCL-2/BAX impliqué dans les phénomènes d'apoptose (Fernandez-Ruiz et al. 2004).

B. Les endocannabinoïdes durant l'adolescence

1. Neurobiologie de l'adolescence

L'adolescence est une phase de développement physique et mental se déroulant entre l'enfance et le jeune adulte. C'est une période qui inclut la maturation sexuelle mais également un remodelage des circuits neuronaux induisant une maturation cognitive, émotionnelle et sociale ce qui permet au jeune individu **d'acquérir les compétences physiques et intellectuelles qui lui seront nécessaires dans sa vie d'adulte**. Chez l'Homme, l'adolescence est comprise entre 12 et 18 ans (Dahl 2004; Spear 2000). Chez le Rat, elle commencerait environ 7 jours avant la puberté pour se terminer quelques jours après. Ainsi, chez le mâle, elle s'étendrait du 35^{ème} au 60^{ème} JPN et chez la femelle du 28^{ème} au 42^{ème} JPN

(Ojeda et al. 2003) en accord avec la maturation physique, neuronale et comportementale se produisant durant cette période. L'adolescence se réfère à un système nerveux en transition, qui va subir un robuste développement neuronal le conduisant à un état mature (Sowell et al. 1999). Ces importants remaniements neuronaux vont avoir lieu, notamment dans les **régions cérébrales spécifiques impliquées dans les processus cognitifs, les émotions et la motivation** (notamment dans les structures limbiques et le cortex préfrontal (CPF)). De nombreuses études (Adriani et al. 2004; Andersen 2003; Bartzokis et al. 2001; Giedd et al. 1999; Laviola et al. 1999; Quinn et al. 2008; Spear 2000; Wolfer and Lipp 1995) ont identifié ces remaniements qui se traduisent principalement par :

- un développement important et une **réorganisation synaptique**
- un **élagage synaptique** permettant une régulation neuronale. Ce phénomène est responsable de l'élimination des synapses sous-utilisées et permet le traitement plus efficace et complexe de l'information.
- des **modifications dans la distribution de neurotransmetteurs** (glutamate, GABA, sérotonine, dopamine) et de leurs récepteurs, contribuant à la maturation du SNC: par exemple, les récepteurs NMDA au glutamate du CPF atteignent leur valeur maximale durant l'adolescence.
- la **myélinisation** des fibres nerveuses permettant une meilleure conduction neuronale
- une importante **neurogénèse** et des modifications dans la densité des épines dendritiques ayant pour but de renforcer les synapses et la plasticité synaptique.

Tous ces changements permettent **une maturation neuronale générale de la connectivité et des processus d'intégration**, qu'ils soient fonctionnels ou structuraux. La plasticité du système nerveux de l'adolescent rend cette période vulnérable aux facteurs environnementaux. C'est souvent lors de l'adolescence que certaines maladies psychiatriques telles que l'anxiété, les troubles de l'humeur, les psychoses, les troubles schizophréniques, les troubles des conduites alimentaires, les troubles de la personnalité et les abus de substances se développent.

2. Système endocannabinoïde et adolescence

Chez l'Homme, l'expression des RCB1 augmente de l'enfance à l'âge adulte, notamment dans le cortex frontal, l'hippocampe (région CA1 et gyrus denté) et les ganglions de la base (Mato et al. 2003). Cependant, aucune étude réalisée chez l'Homme ne démontre de profil spécifique de l'expression des RCB1 durant l'adolescence. Les études menées durant l'adolescence chez le Rat, bien que peu nombreuses aussi, ont tenté de compléter ces informations. Ainsi, il a été montré que l'expression des RCB1 varie fortement pendant l'adolescence, notamment dans le CPF et le noyau accumbens (Nacc). En effet, dans le CPF, l'expression des RCB1 augmente du 10^{ème} JPN au début de l'adolescence (JPN 29-30) puis commence à décroître à partir du milieu de l'adolescence (JPN 38) jusqu'à l'âge adulte (JPN 70) pour atteindre 60 % du niveau d'expression présent au début de l'adolescence (Heng et al. 2010). Dans le Nacc, la densité des RCB1 diminue progressivement du début (JPN29) à la fin de l'adolescence (JPN 50) dans le core, alors qu'à l'inverse, ils vont augmenter dans son shell (Ellgren et al. 2008).

Parallèlement aux variations de densité des RCB1, il existe également des modifications d'expression des ligands endogènes dans ces mêmes régions où les concentrations en anandamide augmentent du début à la fin de l'adolescence, allant jusqu'à atteindre dans le CPF, des taux 3 fois plus concentrés à la fin de l'adolescence. A l'inverse, dans ces structures, les concentrations en 2-AG ont plutôt tendance à diminuer pendant cette période (Ellgren et al. 2008).

Ainsi, le système endoCB subit de profonds remaniements durant l'adolescence. Étant donné l'importance de ce système dans la modulation des processus neurodéveloppementaux et du fait de la mise en place progressive des RCB1 dans des régions fondamentales pour la cognition et les émotions, il est évident que le système endoCB joue un **rôle important dans la maturation du SNC durant l'adolescence, permettant le développement des mécanismes propres au bon fonctionnement des processus cognitifs et émotionnels à l'âge adulte. Le dérèglement du fonctionnement normal de ce système pendant l'adolescence pourrait donc avoir des répercussions à long terme sur le fonctionnement du SNC à l'âge adulte.**

II. Cannabinoïdes, transmission et plasticité synaptique

A. Cannabinoïdes endogènes, exogènes et transmission synaptique

Les endocannabinoïdes jouent un **rôle important dans la modulation de la transmission synaptique**. Du fait de leur production « à la demande » suite à une dépolarisation postsynaptique, ils **interviennent « à contre-courant »** dans la transmission synaptique, afin de **réduire de manière transitoire la libération des neurotransmetteurs**.

Dans le néocortex, les cellules pyramidales synthétisent et libèrent les ligands endogènes, l'anandamide et le 2-AG. Il n'est donc pas étonnant de voir que l'activation des RCB1 module l'activité corticale. Dès 1986, il est montré que l'activation des RCB1 au niveau cortical réduit la transmission synaptique excitatrice chez l'animal anesthésié (Pontzer et al. 1986). L'administration de THC entraîne une réduction significative des réponses évoquées dans trois aires corticales sensorielles de différentes modalités (auditive, somesthésique, visuelle) (Pontzer et al. 1986). Plus tard, il a été montré par des études électrophysiologiques réalisées *in vitro* chez le Rat, que l'activation du RCB1 par des agonistes exogènes (WIN55,212-2 et CP55,940) agit sur la transmission excitatrice et supprime les courants postsynaptiques excitateurs (PPSE) dans des neurones hippocampiques (Shen et al. 1996). Cette activation des RCB1 par les mêmes agonistes induit également une suppression des réponses excitatrices évoquées dans la couche V du CPF et cet effet est rétabli par l'utilisation d'un antagoniste des RCB1 (SR141716) (Auclair et al. 2000). La suppression des courants excitateurs induite par l'activation du RCB1 par des agonistes endogènes ou exogènes a ensuite été rapportée dans d'autres régions cérébrales telles que le striatum, le Nacc et le cervelet (Gerdeman and Lovinger 2001; Kreitzer and Regehr 2001; Levenes et al. 1998; Robbe et al. 2001; Takahashi and Linden 2000). Ce phénomène est appelé DSE (dépolarisation qui induit la suppression de l'excitation).

De la même façon, des études électrophysiologiques réalisées *in vitro* sur des tranches de cortex suggèrent que les endoCB agissent aussi sur la transmission inhibitrice du fait de la

localisation en abondance des RCB1 sur les interneurons GABAergiques. Il a été montré que la dépolarisation des neurones principaux résulterait d'une suppression de la libération de GABA qui serait dépendante des endoCB (Bodor et al. 2005; Fortin et al. 2004; Trettel et al. 2004). D'autres expériences électrophysiologiques menées *in vitro* chez le Rat ont montré que l'activation du RCB1 par des agonistes exogènes (WIN55,212-2 et CP55,940) supprime les courants postsynaptiques inhibiteurs (PPSI) dans l'hippocampe et cet effet est rétabli par un antagoniste des RCB1 (le SR141716) (Hajos et al. 2000; Wilson et al. 2001). Cette suppression des PPSI induite par l'activation du RCB1 a aussi été rapportée dans le striatum, le Nacc, la substance noire réticulée et le cervelet (Chan and Yung 1998; Hoffman and Lupica 2001; Manzoni and Bockaert 2001; Szabo et al. 1998). Ce phénomène est appelé DSI (dépolarisation qui induit la suppression de l'inhibition).

Sur la base de ces observations, la fonction des endoCB dans la dépression à court terme (DSE et DSI) serait de **réguler de façon homéostatique la neurotransmission** au sein des synapses excitatrices glutamatergiques et inhibitrices GABAergiques, en y diminuant la libération des neurotransmetteurs afin de **maintenir l'excitabilité de la synapse à un niveau fonctionnel**. Le rôle de l'endoCB 2-AG serait impliqué dans l'induction de la DSE et de la DSI (Hashimoto et al. 2008).

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, la production et la libération du 2-AG est un processus complexe qui nécessite un influx de Ca^{2+} dans la cellule postsynaptique suite à la dépolarisation postsynaptique. Un blocage de cet influx calcique postsynaptique par des chélateurs abolit la DSE et la DSI (Brenowitz and Regehr 2003; Kreitzer and Regehr 2001; Lenz and Alger 1999; Llano et al. 1991; Ohno-Shosaku et al. 2002; Pitler and Alger 1992). Par conséquent, il est nécessaire d'avoir des concentrations de Ca^{2+} intracellulaire suffisantes et/ou une activation des récepteurs postsynaptiques métabotropiques glutamatergiques (mGluR1/5). La stimulation de ces récepteurs va induire l'activation de la phospholipase C, nécessaire à la synthèse du 2-AG (Chapitre 1). Une fois synthétisé, le 2-AG va activer les RCB1 localisés sur la membrane présynaptique afin de réguler finement la libération des neurotransmetteurs, en modulant **l'activité de certains canaux ioniques** (Figure 16). En effet, l'activation par le 2-AG des RCB1 **situés sur la membrane présynaptique** va entraîner l'inhibition de l'activité des canaux calciques voltage-dépendants de type N, L et Q/P localisés sur le neurone présynaptique. Cette inhibition, médiée par la protéine Gi/o (Ameri et al. 1999) va par conséquent entraîner une **diminution importante de la libération des neurotransmetteurs dans la synapse**.

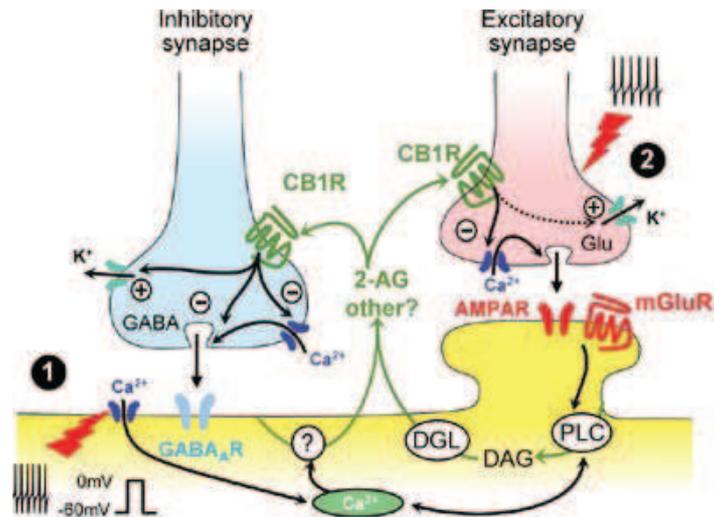


Figure 16 : Résumé schématique de la DSI au sein d'une synapse inhibitrice (à gauche) et de la DSE au sein d'une synapse excitatrice (à droite) (Chevalyre et al. 2006).

De plus, le 2-AG peut stimuler les canaux K^+ de type A voltage-dépendants de façon dose-dépendante, provoquant la diminution de la sensibilité au potentiel de membrane de ces derniers. Cet effet fait suite à l'inhibition de l'adénylate cyclase et à l'inhibition de la protéine kinase A (Hampson et al. 1995). L'activation présynaptique de ces canaux K^+ tend donc à réduire la durée du potentiel d'action et la fréquence de décharge neuronale entraînant une **diminution de l'activité neuronale** et par conséquent une diminution de la libération des neurotransmetteurs. Cet effet complète l'inhibition des canaux Ca^{2+} présynaptiques.

Par ailleurs, le rôle de la DSE est fondamental durant le développement, notamment durant l'adolescence, pour la mise en place des mécanismes inhérents aux processus cognitifs puisqu'il a été montré que dans le CPF, la **DSE est plus robuste chez les rats lors de l'adolescence (JPN 28-35)** comparativement à des rats adultes (JPN 60-75) démontrant encore une fois l'implication et le rôle actif des RCB1 dans le CPF durant l'adolescence chez le rat (Heng et al. 2010).

B. Cannabinoïdes endogènes, exogènes et plasticité synaptique

1. Brefs rappels sur la définition de la PLT et de la DLT dépendante des récepteurs NMDA

Le SNC possède la capacité de s'adapter et d'intégrer de nouvelles informations par des phénomènes de mémorisation et d'apprentissage. Ces processus font appel à la plasticité des synapses. En 1973, Bliss et Lomo montrent que des changements brefs et répétitifs de l'activité des synapses excitatrices dans l'hippocampe provoquent une augmentation persistante de l'efficacité de la transmission synaptique qu'ils appellent potentialisation à long terme ou PLT (LTP pour Long Term Potentiation) (Bliss and Lomo 1973). Plus généralement, les manifestations de la plasticité des synapses qui ont fait l'objet d'études intensives sont la PLT mais aussi la DLT (LTD pour Long Term Depression) qui représentent, respectivement, une augmentation et une diminution de l'efficacité de la transmission synaptique à long terme (Bear and Malenka 1994; Bliss and Lomo 1973). Plus tard, les études

du mécanisme de la PLT démontreront que la stimulation à haute fréquence dépend de l'activation des récepteurs NMDA (Collingridge et al. 1983), d'une dépolarisation postsynaptique suffisante pour évacuer les ions Mg^{2+} qui bloquent le récepteur NMDA voltage-dépendant (Collingridge et al. 1992; Malinow and Miller 1986) et d'une augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans la cellule postsynaptique (Lynch et al. 1983) (Figure 17). La libération massive de glutamate dans la fente synaptique, induite par la dépolarisation de l'élément présynaptique, permet l'activation des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate (AMPA) et l'apparition consécutive de Potentiels Postsynaptiques Excitateurs (PPSE). La forte entrée de Ca^{2+} dans le neurone postsynaptique est essentielle car elle va permettre le recrutement et l'activation de kinases telles que la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC), l'adénylate cyclase, la protéine kinase II calmoduline-dépendante (CaM kinase II) et le facteur de transcription CREB (CRE-binding protein) qui vont participer au maintien de la PLT (Figure 17). Cette phase renforce l'efficacité synaptique, par l'activation de gènes spécifiques et la synthèse de protéines dans le neurone postsynaptique activé.

A l'inverse de la PLT, la dépression à long terme (DLT) est induite par des stimulations répétitives à basse fréquence mais elle nécessite aussi l'activation des récepteurs NMDA (Dudek and Bear 1992; Mulkey and Malenka 1992), provoquant ainsi une augmentation de la concentration du Ca^{2+} au niveau postsynaptique de moindre importance comparée à celle induisant la PLT (Mulkey and Malenka 1992). Comme pour la PLT, la DLT dépend donc d'une augmentation transitoire de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} dans le neurone postsynaptique (Figure 17). Pour ce qui est de la DLT, l'activation de phosphatases et non de kinases comme pour la PLT, entraîne une déphosphorylation (inhibition) des récepteurs de type NMDA et AMPA.

La potentialisation à long terme a un rôle crucial dans les processus de mémorisation, elle permet de renforcer l'efficacité synaptique, de remodeler les synapses déjà existantes et de créer de nouvelles synapses pour la mise en mémoire de nouvelles informations mnésiques (Lang et al. 2004; Segal 2005; Zuo et al. 2005). **La DLT, qui a un rôle pour la mise sous silence des synapses, permettrait de ramener les synapses potentialisées par la PLT à un niveau d'activité basale, les rendant disponibles au stockage de nouvelles informations.** La figure 17 schématise les mécanismes mis en jeu lors de la PLT et la DLT au sein d'une synapse excitatrice.

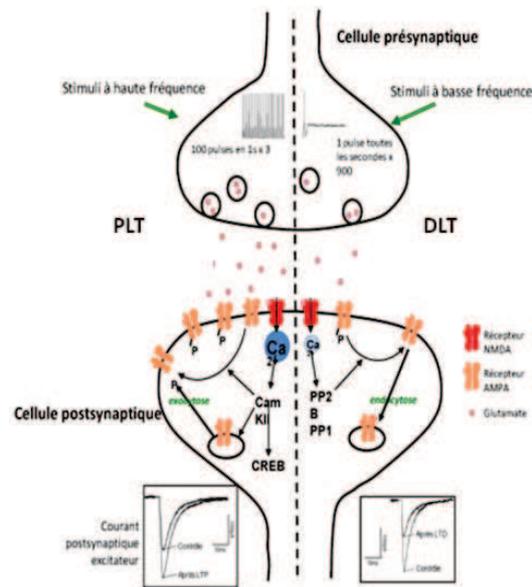


Figure 17 : Schéma de l'induction de la PLT (à gauche) et de la DLT (à droite) au sein d'une synapse excitatrice (Leroux et al 2008).

2. La DLT dépendante des endocannabinoïdes

Le premier rôle des endoCB dans l'expression de la DLT a été démontré en 2002 par Robbe et al sur les synapses **prefronto-accumbens** glutamatergiques et par Gerdeman et al. sur les synapses **corticostriatales** glutamatergiques (Gerdeman et al. 2002; Robbe et al. 2002). Pour l'accumbens, les auteurs ont observé le blocage de la DLT par un antagoniste des RCB1. Pour le striatum, le blocage de la DLT par un agent chélateur du Ca²⁺ est réversé par l'application d'un inhibiteur de la recapture d'anandamide. Enfin, ces deux formes de DLT (striatum et accumbens) ne peuvent être induites chez les souris dépourvues de RCB1 et elles sont bloquées par un antagoniste des RCB1 chez les souris sauvages. Ces résultats suggèrent qu'un messager rétrograde endoCB est impliqué dans l'expression de cette DLT et que si la production d'endoCB est altérée, la DLT ne peut être induite. Ces DLT-endoCB sont également enregistrées dans les cellules de Purkinje du cervelet (Safo and Regehr 2005), dans le cortex visuel (Sjostrom et al. 2003) et au sein de synapses inhibitrices dans les cellules CA1 de l'hippocampe (Chevalayre and Castillo 2003) et dans l'amygdale basolatérale (Marsicano et al. 2002b).

a. Mécanisme de la DLT-endoCB

L'induction de cette DLT nécessite l'activation des RCB1 présynaptiques par la production d'un endoCB synthétisé par le neurone postsynaptique suite à l'augmentation des ions Ca²⁺ intracellulaires et/ou l'activation des mGluR1/5. Les mécanismes d'induction de la DLT-endoCB diffèrent donc des mécanismes des formes communes de DLT puisque son induction ne requiert pas l'activation des récepteurs postsynaptiques glutamatergiques de type NMDA.

La DLT induite par les endoCB est obtenue par la stimulation de fibres glutamatergiques qui entraînent une activation prolongée des récepteurs mGluR1/5 provoquant la forte

production d'endoCB. La stimulation prolongée des RCB1 présynaptiques due à la synthèse en grande quantité d'endoCB entraînerait une **inhibition à long terme de la libération de neurotransmetteurs dans la synapse**. Les DLT-endoCB présentent des mécanismes d'action qui diffèrent selon les structures cérébrales : on parlera de **DLT homosynaptique ou hétérosynaptique**.

Dans le striatum dorsal et le Nacc, la DLT-endoCB est de type homosynaptique. Les neurones épineux de ces structures reçoivent des afférences glutamatergiques qui vont, suite à leur stimulation (à haute fréquence dans le striatum dorsal et faible fréquence dans le Nacc), libérer un endoCB (dont l'identification est encore incertaine) qui activera les RCB1 localisés sur la membrane du neurone présynaptique et provoquer **une diminution de la libération de glutamate dans la synapse** (Gerdeman et al. 2002; Robbe et al. 2002) (Figure 18A).

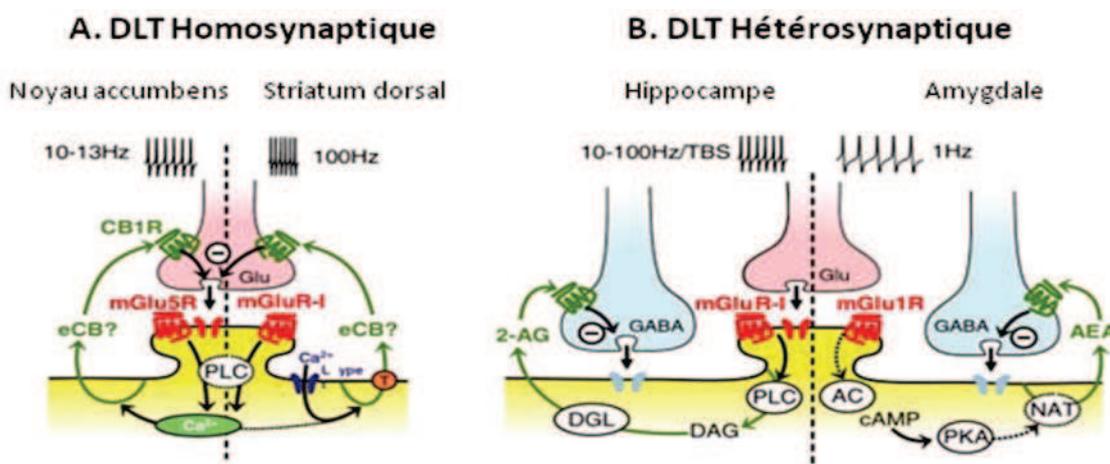


Figure 18 : Schéma illustrant les différentes DLT induites par les endoCB. A. DLT homosynaptique dans le noyau accumbens et le striatum dorsal ; B : DLT hétérosynaptique dans l'hippocampe et l'amygdale (d'après (Chevalyre et al. 2006)

Dans l'hippocampe et l'amygdale basolatérale, la DLT-endoCB est de type hétérosynaptique : des stimulations de neurones pyramidaux dans une synapse excitatrice produisent une DLT au sein des synapses inhibitrices adjacentes. En effet, dans l'hippocampe, les neurones pyramidaux de la région CA1 reçoivent des afférences glutamatergiques provenant des régions CA3 (collatérales de Schaeffer), ainsi que des afférences GABAergiques issues d'interneurones locaux exprimant la cholécystokinine (CCK). Des stimulations répétées à fréquence moyenne ou élevée (10-100 Hz) des collatérales de Schaeffer vont induire la synthèse de 2-AG dans les dendrites des neurones pyramidaux de la région CA1 (via l'activation des mGLUR1/5 et l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire) qui, par action rétrograde, ira activer les RCB1 localisés sur les interneurones GABAergiques adjacents et provoquer la diminution de l'activité de ces interneurones inhibiteurs (Chevalyre and Castillo 2003; Chevalyre et al. 2006). Le même phénomène est observé dans la BLA, à la différence près que l'endoCB impliqué est l'anandamide après stimulation à faible fréquence des afférences glutamatergiques (Figure 18B).

b. Facilitation de la PLT par la DLT-endoCB

La diminution de l'inhibition des neurones pyramidaux dans l'hippocampe et l'amygdale suite à l'activation des RCB1 localisés sur les interneurons GABAergiques est durable et aurait pour conséquence de rendre les neurones plus excitables. Cela pourrait contribuer à faciliter la PLT induite dans ces neurones suite à une stimulation à haute fréquence. En effet, plusieurs études soutiennent cette hypothèse : il a été montré qu'une faible intensité de stimulation (LFS, 100 stimulis à 1 Hz) des afférences excitatrices des neurones de la BLA provoquait une endoCB-DLT au sein des afférences inhibitrices de ces neurones et augmente l'impact des stimulations à haute fréquence sur les PLT à venir, au niveau des afférences excitatrices. On parle alors de la **facilitation de la PLT**, qui se traduit par une augmentation de l'amplitude des PPSE enregistrés dans les neurones de l'amygdale centrale (Azad et al. 2004). De la même façon, un antagoniste des RCB1 (SR141716) bloque l'effet des stimulations à basse fréquence qui induisent la facilitation de la PLT dans cette région (Azad et al. 2004). **Ces observations montrent que la plasticité médiée par les endoCB au sein des synapses inhibitrices provoquerait des effets à long terme au niveau des afférences excitatrices en contrôlant l'excitabilité des cellules.**

Les mêmes effets sont observés dans l'hippocampe : des protocoles de stimulation à haute fréquence (HFS) nécessaire à l'induction de la PLT dans les synapses glutamatergiques entraînent également une DLT-endoCB dans les synapses GABAergiques (Chevalyere and Castillo 2003). De même, il a été montré que la suppression de l'inhibition provoquée par la DSI facilite de façon transitoire l'induction de la PLT hippocampique dans les synapses excitatrices de l'aire CA1 (Carlson et al. 2002). La libération des endoCB provoquée par la dépolarisation d'une cellule pyramidale faciliterait l'induction de la PLT et provoquerait l'activation des RCB1 présents en abondance le long du compartiment somatodendritique des synapses inhibitrices, ce qui affecterait de façon non sélective les synapses glutamatergiques (Chevalyere and Castillo 2004; Martin et al. 2001). Plus tard, les mêmes auteurs ont montré que, suite à des stimulations à haute fréquence, la DLT-endoCB enregistrée au sein des afférences inhibitrices facilitait durablement et considérablement l'induction de la PLT au sein des afférences excitatrices de l'aire CA1 (Chevalyere and Castillo 2004).

Ainsi, **les endoCB semblent réguler l'induction de la PLT** au niveau des synapses excitatrices. Cet effet pourrait être transitoire ou durable, et dépendrait de la quantité d'endoCB libérée. Cependant, l'induction de la PLT au niveau des synapses excitatrices glutamatergiques dans l'hippocampe ne nécessite pas obligatoirement l'action des endoCB, mais reste sensible à l'intensité de la stimulation de ces derniers.

En résumé, les endoCB agiraient comme des médiateurs qui ajusteraient la charge synaptique au sein de synapses spécifiques. Ils joueraient ainsi un rôle crucial dans la plasticité synaptique en **contrôlant la fonction des synapses et l'excitabilité des réseaux à court ou à long terme**, par une action de rétrocontrôle négatif au sein d'une même synapse ou de synapses adjacentes et ce, dans plusieurs régions du SNC. **Cette régulation en finesse de la transmission synaptique par les endoCB serait cruciale pour la modulation de différentes fonctions du SNC, notamment dans le traitement des informations nécessaires aux processus cognitifs et émotionnels.**

Dés lors, on peut se poser la question de l'interaction entre endoCB et cannabinoïdes exogènes et de son effet dans la régulation de la plasticité : est ce qu'un apport de cannabinoïdes exogènes, par une exposition accrue ou chronique, pourrait influencer la régulation de la transmission synaptique médiée par les endoCB ?

C. Interaction entre cannabinoïdes exogènes, cannabinoïdes endogènes et plasticité synaptique

Si les multiples rôles des endoCB dans la modulation de la transmission synaptique, l'excitabilité des neurones et la régulation de différentes formes de plasticité sont maintenant clairement établis, les études qui tentent de comprendre l'interaction des cannabinoïdes exogènes (par l'apport de concentrations accrues ou chroniques) avec le fonctionnement physiologique des endoCB dans ces phénomènes sont peu nombreuses. Ainsi, il a été montré, *in vitro* sur des cultures autaptiques de neurones d'hippocampe de souris (neurones isolés *in vitro* contraints à se développer sur une surface restreinte et à faire des synapses sur eux-mêmes) que des concentrations accrues de THC antagonisaient les différentes formes de plasticité DSE et DLT (Straiker and Mackie 2005; 2007). De la même façon, toujours chez le Rat, *in vitro*, une application d'agonistes des RCB1 (WIN55,212-2) favorise la DLT aux dépens de la PLT dans le CPF et à l'inverse, une application d'antagonistes (SR141716) augmente la proportion de cellules répondant à des stimulations à haute fréquence avec induction de la PLT aux dépens de la DLT (Auclair et al. 2000). De plus, l'administration d'une forte concentration de WIN55,212-2 (0.5 mg/kg, ip) chez le Rat altère la PLT enregistrée *in vivo* dans la région CA1 de l'hippocampe (Abush and Akirav 2010).

Par ailleurs, l'effet psychotoxique des cannabinoïdes exogènes est également mis en évidence par différentes études *in vivo* ou *in vitro* chez le rongeur. Il a été montré chez le Rat qu'une exposition chronique durant 7 jours à des agonistes des RCB1 (THC, 10 mg/kg ou WIN55,212-2, 10mg/kg) altère la DLT-endoCB enregistrée *in vitro* dans le Nacc (Hoffman et al. 2003). Plus tard, les auteurs ont montré que la même exposition chronique au THC altérerait également l'induction de la PLT enregistrée dans cette région (Hoffman et al. 2007). Cet effet était rétabli seulement 14 jours après la dernière administration de THC, alors que l'administration de l'antagoniste des RCB1 (AM251) avant chaque injection de THC prévenait ce blocage de la PLT. Aussi, l'exposition chronique durant 15 jours avec le cannabinoïde synthétique HU210 chez le Rat altère la PLT enregistrée *in vivo* dans les projections CA3-CA1 de l'hippocampe avec des effets pouvant perdurer jusqu'à 18h après la dernière exposition (Hill et al. 2004). Ces déficits de la PLT ont été mis en parallèle avec des déficits durables de la mémoire de travail et de la mémoire de référence chez les rats testés dans la piscine de Morris. Les mêmes effets déficitaires sur l'induction de la PLT sont retrouvés dans la voie projetant du subiculum ventral vers le Nacc *in vivo*, suite à des administrations chroniques (durant 15 jours) de WIN55, 212-2 (1.2 mg/kg). Ces effets peuvent persister encore 10 jours après la dernière administration (Abush and Akirav 2012). Dans cette étude, les auteurs ont mis en parallèle des déficits cognitifs durables de la mémoire à court terme et de la mémoire spatiale chez les rats testés respectivement dans le test de la reconnaissance d'objets et le test de la localisation d'objets (Abush and Akirav 2012)

Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels l'exposition chronique aux cannabinoïdes exogènes altère la plasticité synaptique restent à être élucidés. Il a été postulé, de par la localisation en abondance des RCB1 sur les terminaisons glutamatergiques, que les déficits de la PLT provoqués par l'apport exogène d'agonistes cannabinoïdes seraient liés à des réductions d'expression et de fonction des récepteurs au glutamate et de la phosphorylation de CREB. En effet, une exposition chronique au THC pendant 7 jours, chez la Souris, réduit de façon significative l'expression des sous-unités GluR1 des récepteurs AMPA, des sous-unités NR2A et NR2B des récepteurs NMDA et de la phosphorylation de CREB. Ces diminutions semblent préservées chez les animaux recevant l'antagoniste SR141716 ou chez les souris CB1^{-/-}, indiquant que les modifications de l'expression des sous-unités des récepteurs au glutamate pourraient être médiées par le RCB1 (Fan et al. 2010).

En résumé, l'activation des RCB1 par des **concentrations accrues ou chroniques de cannabinoïdes exogènes semble interférer avec les mécanismes régulateurs des endoCB sur la plasticité synaptique dans** l'hippocampe, le Nacc et le CPF. Il a été postulé que l'apport chronique de cannabinoïdes exogènes provoquerait une diminution du nombre de RCB1 et, par conséquent, une désensibilisation de la réponse aux endoCB dans ces régions-clés (Straiker and Mackie 2005). Cette désensibilisation pourrait altérer l'expression de la DLT induite par les cannabinoïdes, l'expression de la PLT et, à fortiori, compromettre **les processus cognitifs et émotionnels.**

L'ensemble de ces données nous laisse penser qu'une consommation de cannabis, notamment si elle a lieu durant l'adolescence, période de maturation structurelle et fonctionnelle du CPF et du système limbique, pourrait interférer avec la plasticité synaptique et le fonctionnement neuronal et aboutir à des changements durables de l'organisation neuronale.

Il est donc primordial d'analyser les différents usages du cannabis chez les adolescents, afin de dresser un bilan épidémiologique de la réalité de ces comportements. Ce bilan devrait nous permettre d'appréhender les conséquences à long terme d'une consommation de cannabis durant cette période d'intense remaniement neuronal qu'est l'adolescence.

Chapitre III. Épidémiologie

I. Utilisation et consommation de cannabis : bref historique.

Dans l'antiquité Grecque et Romaine du fait de sa richesse en fibres, le cannabis, était utilisé dans la marine, pour la fabrication de voiles et de cordages. Puis on a vu les effets psychotropes du cannabis associés à des rituels religieux chez les Hindous. Les usages thérapeutiques et rituels du cannabis se sont ensuite étendus vers le Moyen-Orient, l'Égypte et la Grèce Antique avant d'arriver en Europe au XVIII^{ème} siècle, après la campagne de Napoléon en Égypte.

En France, c'est au XIX^{ème} siècle que la consommation de cannabis a connu son apogée culturelle. Plusieurs personnalités du monde littéraire et artistique, en recherche de paradis artificiels et désireux de rompre avec le conformisme ambiant, se retrouvaient dans le « club des haschischins » à Paris, chez le peintre Fernand Boissard, afin d'y déguster ce qu'ils nommaient la « confiture verte » (cannabis) (Figure 19). Les séances étaient appelées par les membres du club « les fantasias ». Ce club, voué à l'étude et à l'expérience du haschich, fut fondé en 1844 par le Dr Joseph Moreau de Tours, un médecin spécialisé dans l'aliénation. Le but était d'étudier les effets du haschich sur le corps et l'esprit. De ces expériences, Moreau de Tours puisera la substance de son livre « Du haschich et de l'aliénation mentale » paru en 1845 (Figure 19), dans lequel il établit une équivalence entre rêves, délires et hallucinations liées au haschich. Il s'agit du premier ouvrage scientifique traitant des drogues et de leurs effets sur le corps humain. Selon lui, « le cannabis installe le rêve sans sommeil ».

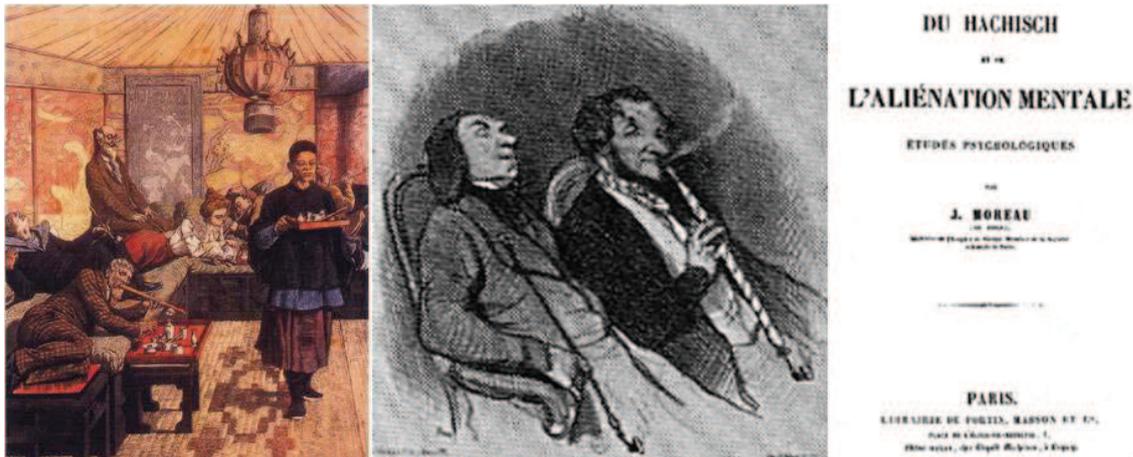


Figure 19 : de gauche à droite : Le peintre Daumier, participant aux « fantasias », aimait dessiner et caricaturer les membres du « Club de Haschischins » pendant les séances/ Couverture du livre de Moreau de Tours « Du haschich et de l'aliénation mentale », publié en 1845, premier ouvrage scientifique traitant des drogues et de leurs effets sur le corps humain.

II. La consommation de cannabis de nos jours

A. Recueil des données

En France, les enquêtes relatives à la consommation de substances psychoactives, menées par la Mission Interministérielle de Lutte contre la Drogue et la Toxicomanie (MILDT) n'ont réellement débuté que dans les années 90. Les rapports sont rédigés puis publiés par l'Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies (OFDT). Les tendances de consommation sont évaluées selon le dispositif TREND « Tendances Récentes Et les Nouvelles Drogues », en s'appuyant sur 11 sites d'observation en France Métropolitaine et Outre-Mer. Les données proviennent de l'Enquête sur la Santé et les Consommations lors de l'Appel de Préparation à la Défense (ESCAPAD) menée auprès des adolescents de 17 ans accomplissant leur journée d'appel de préparation à la défense (JAPD), aujourd'hui appelée Journée Défense et Citoyenneté (JDC). Ces données complètent celles du baromètre-santé du Comité Français d'Education pour la Santé (CFES) qui sont recueillies auprès de la population générale adulte ou jeune et celles de l'enquête ESPAD (European School Survey Project on Alcohol and other Drugs) menée tous les 4 ans en population scolaire. Cette dernière enquête offre une observation des usagers chez les jeunes adolescents, en particulier ceux âgés de 12 à 16 ans restant majoritairement scolarisés. Ces enquêtes sont effectuées sous la responsabilité scientifique conjointe de l'OFDT et de l'équipe « Santé de l'Adolescent » de l'INSERM U669 dirigée par le Pr. Bruno Falissard, en partenariat avec le Ministère de la Jeunesse, de l'Education Nationale et de la Recherche (MJENR), du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche et du Secrétariat Général de l'Enseignement Catholique.

En Europe, l'OEDT (Observatoire Européen des Drogues et Toxicomanies ou EMCDDA European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction), avec la participation de l'OFDT, a pour mission de recueillir, analyser et diffuser des informations factuelles et comparables à l'échelle Européenne en matière de consommation de drogues. L'enquête ESPAD fournit également des données sur celle-ci chez les jeunes européens scolarisés âgés de 15 et 16 ans et permet de dresser un portrait de la jeunesse Européenne. La dernière enquête s'est déroulée en 2011 et a réuni 36 pays dont la France. Ces études sont supportées par le SNIPH (Institut National Suédois de Santé Publique), le Groupe Pompidou et la cellule du Conseil de l'Europe chargée de la lutte contre la toxicomanie. D'autres enquêtes transversales répétées sont menées en population scolaire et portent spécifiquement sur les 11-15 ans (Health Behaviour in School-aged Children - HBSC).

Toutes ces études font la distinction entre :

- **Une expérimentation** : usage au moins une fois au cours de la vie
- **Un usage dans l'année** : au moins un usage au cours de l'année écoulée
- **Un usage dans le mois** : au moins un usage au cours du dernier mois précédant l'enquête
- **Un usage régulier** : au moins dix usages au cours du dernier mois précédant l'enquête
- **Un usage quotidien** : au moins un usage quotidien au cours des trente derniers jours

Ces approches ont été quantifiées uniquement à partir d'auto-questionnaires et sont donc différentes d'une approche clinique dans laquelle le diagnostic est posé à partir d'un recueil symptomatique. De ce fait, il est impossible de poser un diagnostic d'abus ou de dépendance

en fonction du niveau de consommation et les données doivent être interprétées avec précaution.

B. Consommation de cannabis en Europe et dans le Monde

1. En Europe

Le cannabis est la drogue illicite la plus répandue en Europe et sa consommation a augmenté entre 1990 et le début des années 2000. Depuis, il semblerait que l'Europe soit entrée dans une phase de stabilisation, voire de diminution. Ceci dit, la consommation de cannabis reste tout de même élevée.

a. En population générale

Selon une estimation au sein de la population Européenne âgée de 15 à 64 ans (Tableau 3) :

- 23,2 % ont expérimenté le cannabis au moins une fois au cours de leur vie. La plupart des pays rapportent des estimations de la prévalence allant de 10 à 30 % pour l'ensemble de la population (OEDT 2011)
- près de 7 % en ont consommé au cours de l'année écoulée
- 3,6 % en ont consommé au cours du dernier mois.

Tranche d'âge	Période de consommation		
	Au cours de la vie	Dernière année	Dernier mois
15/64 ans			
Nombre estimé de consommateurs en Europe	78 Millions	22,5 Millions	12 Millions
Moyenne Européenne	23,20%	6,70%	3,60%
Pays où la prévalence est la plus faible	Roumanie (1,5 %) Malte (3,5 %) Bulgarie (7,3 %) Hongrie (8,5 %)	Roumanie (0,4 %) Malte (0,8 %) Grèce (1,7 %) Hongrie (2,3 %)	Roumanie (0,1 %) Malte (0,5 %) Grèce (0,9 %) Pologne (0,9 %) Suède (1%)
Pays où la prévalence est la plus élevée	Danemark (32,5 %) Espagne (32,1 %) Italie (32 %) France; Royaume-Uni (30,6 %)	Italie (14,3 %) République Tchèque (11,1 %) Espagne (10,6 %) France (8,6 %)	Espagne (7,6 %) Italie (6,9 %) France (4,8 %) République Tchèque (4,1 %)

Tableau 3 : Prévalence de la consommation de cannabis dans la population générale. Résumé des données Européennes (OEDT 2011).

b. Chez les jeunes adultes et les adolescents

La prévalence la plus élevée de la consommation de cannabis au cours de l'année apparaît chez les 15/24 ans. Dans cette tranche d'âge, les estimations montrent que (OEDT 2011) :

- 30 % auraient expérimenté le cannabis au moins une fois au cours de leur vie.
- 15,2 % auraient consommé du cannabis au cours de l'année écoulée
- 8 % en auraient consommé au cours du dernier mois.

Ces estimations varient fortement d'un pays à l'autre et la consommation est généralement plus élevée chez les hommes que chez les femmes.

L'enquête ESPAD, menée en 2011 dans 36 états membres de l'Union Européenne ainsi qu'en Croatie et au Royaume Uni montrent que les prévalences, au cours de la vie, de **la consommation de cannabis chez les jeunes scolarisés de 15 et 16 ans sont les plus élevées** en République Tchèque et en France (42 % vs. 39 %, respectivement), alors que les Norvégiens et jeunes Moldaves restent parmi ceux dont les niveaux sont les plus faibles (6 %).

Les prévalences varient selon les pays Européens et sont fonction du mode de vie, du développement social, de l'hédonisme et de la propension à faire « la fête ». Il y aurait une composante éthique et culturelle fondamentale ainsi que des mœurs qui sont propres aux différentes cultures et pays.

On pourrait penser que la différence de consommation entre les différents pays Européens pourrait être liée à des **modifications de réformes législatives antidrogues** au sein de ces pays. En effet, au cours de la dernière décennie, plusieurs pays Européens ont modifié leur législation à ce sujet, en renforçant les peines (comme en Italie, par exemple) ou en les réduisant (comme au Royaume Uni ou en Slovaquie). Mais à ce jour, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les modifications législatives et la prévalence de la consommation de cannabis (OEDT 2011).

2. Consommation de cannabis dans le reste du monde

Aux États-Unis, l'Enquête Nationale sur la Consommation de Drogue et Santé (SAMHSA 2010) estimait à 51,6 % la prévalence de la consommation de cannabis au cours de la vie chez les 16/34 ans et à 24,1 % sa prévalence au cours de l'année écoulée.

Chez les adolescents âgés de 15 et 16 ans, elle est de 30 % au cours de la vie et de 16,7 % au cours du dernier mois (SAMHSA 2010). Au Canada et en Australie, les données sont sensiblement les mêmes qu'aux États-Unis et s'apparentent à celles observées aux moyennes Européennes.

C. Consommation de cannabis en France

1. En population générale

En 2010, au sein de la population des adultes âgés de 18 à 64 ans (Beck et al. 2011) :

- 33 % ont expérimenté le cannabis au cours de leur vie, les hommes étant plus consommateurs que les femmes (41 % contre 25 %).
- 8 % en ont consommé au cours de l'année écoulée (11 % des hommes et 5 % des femmes)
- 4 % en ont consommé au cours du dernier mois.

La proportion d'individus ayant expérimenté le cannabis au cours de leur vie est maximale entre 26 et 34 ans, surtout pour les hommes qui comptent 64 % de consommateurs (contre 40 % pour les femmes). Cette proportion diminue ensuite pour atteindre 13 % entre 55 et 64 ans (contre 7 % chez les femmes) (Figure 20).

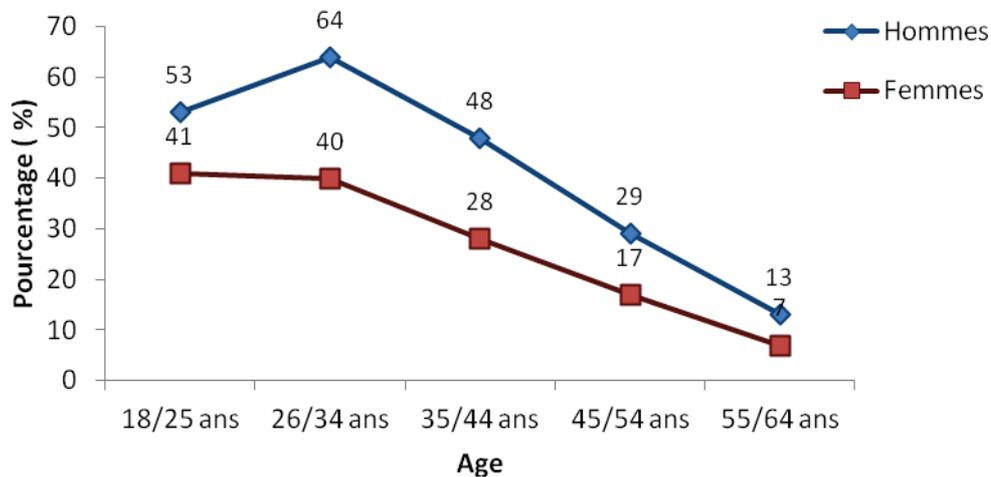


Figure 20 : Proportions de consommateurs de cannabis en France au cours de la vie en fonction de l'âge et du sexe (Beck et al. 2011).

2. Chez les adolescents

Chez les adolescents, l'expérimentation est très faible entre 11 et 13 ans mais s'intensifie à partir de 15 ans (Legleye et al. 2009; Legleye et al. 2008). Entre 2007 et 2011, la consommation de cannabis au cours du mois chez les jeunes Français de 15 et 16 ans (chez les filles comme chez les garçons) a fortement **augmenté, passant respectivement de 15 % à 24 %** (Figure 21) ce qui est 3 fois supérieur à ce qui est déclaré en moyenne dans l'ensemble des pays Européens (7 %).

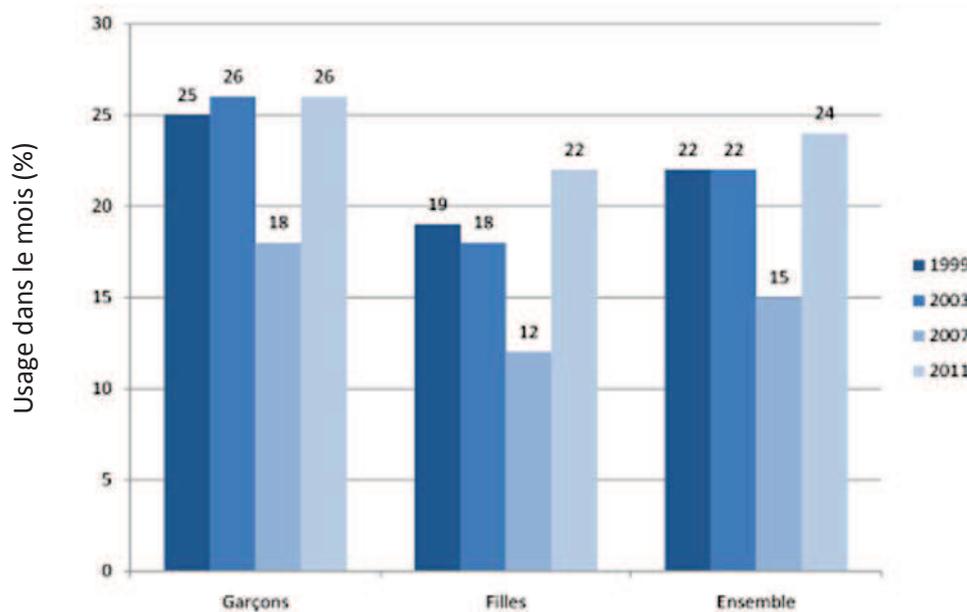


Figure 21 : Evolution des usages de cannabis déclarés au cours du mois (en %) selon le sexe en France entre 1999 et 2011 chez les adolescents de 15 et 16 ans (Hibell et al. 2012).

La France est le seul pays Européen pour lequel l'usage est supérieur à 15 % (Figure 22) ce qui **positionne aujourd'hui les adolescents Français en tête des consommateurs de cannabis en Europe** (Hibell et al. 2012) (Figure 22)



Figure 22 : Cartographie de l'usage de cannabis au cours du mois en 2011 en Europe chez les jeunes âgés de 15 et 16 ans (Hibell et al. 2012).

Vers la fin de l'adolescence, à 17 ans, l'expérimentation de cannabis devient un comportement majoritaire, surtout chez les garçons. Les premiers résultats de l'enquête ESCAPAD recueillis en 2011 montrent que (Spilka et al. 2012) (Figure 23) :

- 41,5 % ont expérimenté le cannabis au cours de leur vie (44 % des garçons et 38,9 % des filles)
- 34,6 % en ont consommé au cours de l'année écoulée (37,8 % des garçons et 31,2 % des filles)
- 22,4 % en ont consommé durant le dernier mois (26,3 % des garçons et 18,4 % des filles)
- 6,5 % en ont consommé de façon régulière (9,5 % des garçons et 3,4 % des filles)

Depuis 2002, on constate une baisse de la prise régulière ou quotidienne de cannabis à 17 ans. Mais ces usages restent très préoccupants car ils sont supérieurs aux moyennes Européennes (Spilka et al. 2012).

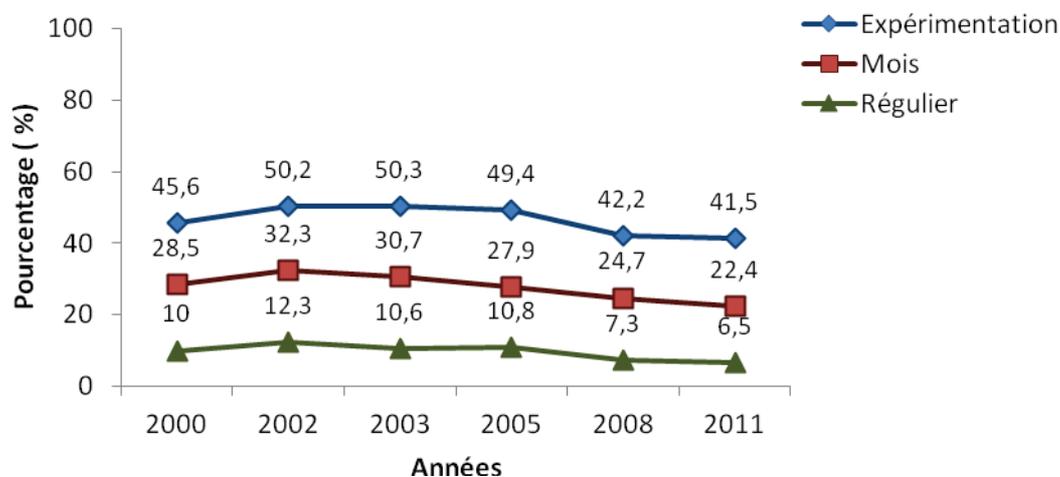


Figure 23 : Évolutions des usages de cannabis en France de 2000 à 2011 chez les adolescents de 17 ans en France (Enquête ESCAPAD 2011) (Spilka et al. 2012).

Cette importante consommation de cannabis chez les adolescents semble être liée aux phénomènes de sociabilité qui tiennent chez eux une place importante: près de 63 % des adolescents interrogés passent du temps dans les bars avec leurs amis et 84 % d'entre eux participent régulièrement à des soirées. La consommation de cannabis est élevée chez les jeunes qui fréquentent les boîtes de nuit, les bars et les événements musicaux (concerts, festivals) et semble associée à celle du tabac et/ou de l'alcool chez les adolescents de 15 à 18 ans (on parle de polyconsommation). Ces profils de sociabilité diffèrent entre les sexes, puisque les garçons seraient plus sujets à ce comportement, ce qui expliquerait la plus forte consommation de cannabis chez eux.

Par ailleurs, il apparaît que la grande fréquence des consommations de cannabis à l'adolescence soit liée à l'accessibilité spatiale, temporelle et financière du cannabis. En effet, les enquêtes ESPAD qui ont considéré l'accessibilité des produits psychoactifs rapportent qu'à la question « Si vous le vouliez, vous serait-il difficile de vous procurer du cannabis », la plupart des adolescents déclare que cela ne leur est pas difficile. En général, ils connaissent les endroits où s'en procurer rapidement et les personnes à qui s'adresser. Le cannabis est donc une **drogue disponible et facilement accessible pour les adolescents**.

III. Motifs et modes de consommation du cannabis

Les motifs d'une consommation de cannabis chez les adolescents sont variés : ils sont à la recherche de détente, de sensations et de plaisir, ils sont animés par leur curiosité, ils ont « envie de s'amuser », cherchent à passer des moments de convivialité entre eux ou encore à « faire comme les autres » pour éviter d'être exclus d'un groupe.

La consommation de cannabis concerne généralement tous les milieux sociaux mais est particulièrement élevée chez les jeunes confrontés à des problèmes familiaux ou manifestant des signes de malaise psychologique. Les risques pour la santé diffèrent selon les types de produits à base de cannabis ainsi que de leur mode de consommation. En effet, les analyses de résines de cannabis saisies en France révèlent que la **concentration en principe actif a considérablement augmenté** ces dernières années. Si la majorité des échantillons saisis contient environ 10 % de THC, 15 % en contiennent jusqu'à 32 % (Mura et al. 2006). En effet, avec les techniques horticoles avancées (sélection génétique, cultures hydroponiques, etc.), de **nouveaux produits à teneur décuplée en THC sont arrivés sur le territoire Français**. Il s'agit de la « skunk » et de la « super skunk » (variétés de fleurs de cannabis originaires des États-Unis et des Pays-bas).

De plus, selon le mode de consommation, les doses de THC peuvent se multiplier et entraîner une dépendance ou d'autres effets que nous énumérerons par la suite. Il est rare que les enquêtes de population fassent une distinction entre les différents modes de consommation de cannabis. Le mode de consommation le plus fréquent est l'inhalation. En effet, le produit peut être fumé avec des cigarettes de cannabis, appelés « joints, bédots » ou avec une pipe à eau appelée « bang, douille ». Selon sa longueur, beaucoup de fumée est inhalée et permet à l'individu d'ingérer plus de THC. Certains utilisateurs gardent longtemps la fumée dans leurs poumons afin que le THC soit absorbé en plus grande quantité. Cette pratique est dangereuse puisque, comme nous l'avons vu précédemment, le THC est assimilé très rapidement par l'organisme et sa grande lipophilie le fait parvenir très rapidement et en concentration massive dans le SNC. Ce dernier mode de consommation apparaît lié à la **recherche d'un effet brutal et puissant chez les adolescents** rappelant les effets des « shoots » provoqués par l'injection intraveineuse d'autres drogues. Sur un forum destiné aux adolescents sur Internet (cannaweed.com), à la question « pourquoi l'effet du bang est-il plus "fort" que l'effet d'un joint ? », la plupart des jeunes consommateurs rapporte que ce mode de consommation leur procure des effets plus rapides et intenses avec un état d'ébriété. C'est une étape dans le processus de l'escalade induit par les effets de tolérance.

IV. Précocité des consommations et problème de santé publique

En moyenne, les adolescents s'initient au cannabis dès leur 15^{ème} année, à l'âge où ils connaissent leur première ivresse et un an après avoir fumé leur première cigarette (Spilka et al. 2012). L'usage du cannabis a souvent été banalisé et on l'associe encore trop souvent à une drogue douce inoffensive que les adolescents consomment de façon transitoire. Cette idée reçue est fortement remise en question par des évidences accumulées : **l'usage régulier est devenu majoritaire chez les adolescents et l'usage quotidien est très fréquent**. Plus inquiétant, les produits consommés sont de plus en plus concentrés en principe actif et les

modes de consommation montrent que les adolescents sont à la recherche d'effets brutaux. **L'âge précoce de l'initiation ainsi que la concentration plus forte en principe actif font de ce phénomène un véritable danger de santé publique.** Une enquête Eurobaromètre publiée en Juillet 2011 (Eurobarometer 2011) par la Commission Européenne montre qu'une consommation régulière de cannabis est perçue comme représentant un **risque élevé pour la santé** par 67 % des jeunes gens interrogés (entre 15 et 24 ans). D'autre part, plus l'individu consomme le cannabis tôt dans sa vie, plus celui-ci augmente la probabilité d'avoir des conduites à risque et même de développer plus tard dans sa vie, des troubles cognitifs et/ou psychotiques apparentés à ceux de la schizophrénie. En effet, **l'effet psychotrope serait plus nocif chez les individus au cours de leur développement du fait qu'il intervient sur un système neurobiologique fragile** pouvant provoquer des distorsions.

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, le système endocannabinoïde joue un rôle fondamental lors de l'adolescence pour la mise en place des mécanismes inhérents aux processus cognitifs et émotionnels et il semblerait que ces mécanismes régulateurs puissent être perturbés par un apport exogène de cannabinoïdes, surtout au cours de cette période de grande vulnérabilité. Si les effets immédiats de la consommation de cannabis sont connus depuis longtemps, sa précocité et sa régularité chez les adolescents constituent un phénomène nouveau dont on commence seulement depuis la fin des années 90, à mesurer les effets sur la santé mentale. Ainsi, la consommation régulière de cannabis à l'adolescence reste une réelle source de préoccupation et fait l'objet d'une attention particulière de la part des acteurs de santé et de prévention, qui multiplient leur campagne de prévention auprès des adolescents (Figure 24).



Figure 24 : Diverses affiches pour des campagnes de prévention concernant la consommation de cannabis chez les adolescents.

Quels sont les effets liés à une consommation régulière de cannabis ? L'adolescent est-il en danger ?

Le prochain chapitre abordera les conséquences d'une consommation de cannabis, notamment durant l'adolescence chez l'homme ainsi que chez l'animal.

CHAPITRE IV. Les troubles induits par la consommation de cannabis

I. Les conséquences liées à une consommation aigüe de cannabis

A. L'ivresse cannabique

L'ivresse cannabique a été caractérisée par Moreau de Tours en 1845 lors de consommation à fortes doses de THC (Tours 1845). Elle est bien décrite chez des sujets naïfs ou chez des consommateurs occasionnels. Elle associe un sentiment de bonheur, de bien-être, une excitation, une dissociation des idées, une perte de la notion du temps et de l'espace, des perceptions sensorielles modifiées. Les effets dépendent de la sensibilité individuelle, de l'état émotionnel, de la quantité et de la concentration en principe actif mais aussi de la qualité de l'entourage et du moment de la consommation (Laqueille et al. 2008). Les effets du cannabis se font ressentir 7 à 10 minutes après la consommation et les manifestations psychosensorielles, qui persistent entre 4 et 8h, comprennent (1) un bien-être avec euphorie, une exaltation imaginative et (2) des modifications sensorielles : les sensations corporelles et les capacités auditives, visuelles, gustatives sont modifiées (sensibilité accrue aux sons, sens du rythme plus développé, perception plus vive des couleurs, illusions visuelles, perception du temps ralenti, impression de flotter, de planer, augmentation de la perception des saveurs et du goût).

Ces modifications sensorielles ont été très bien relatées par Charles Baudelaire et Théophile Gautier, au milieu du 19^{ème} siècle, dans certains de leurs écrits :

« [...] Votre amour inné de la forme et de la couleur trouvera tout d'abord une pâture immense dans les premiers développements de votre ivresse. Les couleurs prendront une énergie inaccoutumée et entreront dans le cerveau avec une intensité victorieuse. Délicates, médiocres, ou même mauvaises, les peintures des plafonds revêtiront une vie effrayante ; les plus grossiers papiers peints qui tapissent les murs des auberges se creuseront de splendides dioramas [...] La musique [...] vous parle de vous-même et vous raconte le poème de votre vie : elle s'incorpore à vous et vous vous fondez en elle. Elle parle votre passion [...] d'une manière circonstanciée, positive, chaque mouvement du rythme marquant un mouvement connu de votre âme, chaque note se transformant en mot, et le poème entier entrant dans votre cerveau comme un dictionnaire de vie. »

Charles Baudelaire
Le poème du haschisch
(Baudelaire 1860)

« Le diner tirait à sa fin, déjà quelques-uns des plus fervents adeptes ressentaient les effets de la pâte verte : j'avais pour ma part éprouvé une transposition complète de goût. L'eau que je buvais me semblait avoir la saveur du vin le plus exquis, la viande se changeait dans ma bouche en framboise et réciproquement. »

Théophile Gautier
Le Club des Hachichins
(Gautier 1846)

B. Altérations cognitives

Chez le volontaire sain, une prise de cannabis induit des altérations cognitives qui persistent 24h après la consommation. On retrouve principalement :

- **Des altérations de la mémoire de travail** se traduisant par une diminution des performances en rappel libre (altération de la capacité des sujets à se rappeler de mots énoncés précédemment, d'images présentées ou même de sons entendus). Les déficits se ressentent immédiatement ou plusieurs minutes après la présentation des stimuli (Hall 1995; Hall and Solowij 1998).
- **Des déficits d'attention et de concentration** (Karila et al. 2005).
- **Des perturbations dans les capacités d'apprentissage** et les capacités à résoudre des opérations arithmétiques simples (Karila et al. 2005).
- **Un temps de réaction allongé** (Ameri 1999; Hall and Solowij 1998)
- **Une flexibilité comportementale altérée**

C. Altérations psychomotrices

Le cannabis altère les fonctions psychomotrices à court terme et ces altérations comprennent (Ameri 1999; Chait and Zacny 1992):

- **des altérations de la coordination perceptivo-motrice** : diminution de la vitesse de la poursuite visuelle dans le champ central et périphérique après 15 min d'inhalation de cannabis. Ces effets persistent plus de 5h.
- **une incoordination motrice et une diminution des réflexes moteurs**

D. Autres manifestations somatiques

Des crampes épigastriques, une sécheresse buccale, des troubles du transit, une hyperorexie, une hyperthermie conjonctivale, une dilatation pupillaire et plus rarement, une bronchodilatation, de la tachycardie et des palpitations peuvent être rencontrés après la consommation aiguë de cannabis.

II. Les conséquences d'une consommation chronique au cannabis : L'adolescent est-il en danger ?

A. Troubles cognitifs

L'exposition chronique et régulière au cannabis entraîne des perturbations fonctionnelles durables des fonctions cognitives se traduisant par des altérations de la mémoire de travail, de la mémoire épisodique (déficits dans l'encodage, le stockage et/ou le rappel) et de la mémoire à court terme. Des déficits de concentration et d'attention, des troubles de l'apprentissage des mots, des altérations des fonctions exécutives (Fontes et al. 2011; Pope et al. 1997; Pope and Yurgelun-Todd 1996; Solowij et al. 2002) et une augmentation du temps de réaction sont aussi retrouvés. Ces déficits sont proportionnels à la fréquence, la dose et l'âge de début de consommation (Solowij and Battisti 2008). Bien que réversibles, les

effets déficitaires sont durables : les usagers chroniques peuvent ressentir ces effets après 3 mois d'abstinence (Karila and Reynaud 2003). Néanmoins, **lorsque la consommation de cannabis est précoce, avant l'âge de 17 ans, ces déficits cognitifs sont irréversibles et persistent à l'arrêt de la consommation** (Pope et al. 2001; Schweinsburg et al. 2008). Ces consommateurs précoces présenteront à long terme des temps de réaction plus long, une perte de QI pouvant atteindre jusqu'à 8 points ainsi que d'importants troubles attentionnels et de mémoire (Ehrenreich et al. 1999; Meier et al. 2012; Poo 2001; Pope and Yurgelun-Todd 1996) comparativement à des consommateurs plus tardifs (après l'âge de 17 ans) et à des sujets non consommateurs. Les études d'imagerie cérébrale IRM (imagerie à résonance magnétique) et TEP (tomographie par émission de positons) ont permis d'évaluer le retentissement d'une consommation chronique de cannabis sur le fonctionnement de zones cérébrales impliquées dans les phénomènes de mémorisation et d'attention. Elles montrent qu'une consommation chronique précoce (avant l'âge de 17 ans) entraîne une diminution du volume de la matière grise par rapport au volume cérébral total ainsi que des modifications de flux sanguin cérébral, notamment dans le cortex préfrontal et temporal (Amen and Waugh 1998; Wilson et al. 2000). **Ces observations démontrent la psychotoxicité à long terme des cannabinoïdes exogènes plus grave lorsqu'elle se situe durant l'adolescence dans les régions-clés nécessaires pour l'apprentissage et la mémoire, à savoir l'hippocampe, le cortex préfrontal, le cortex temporal.**

B. Troubles psychiatriques

1. Cannabis et troubles anxieux

Les troubles anxieux sont les complications les plus fréquemment rencontrées lors de l'usage abusif et chronique de cannabis, les plus hauts niveaux d'angoisse concernant généralement les grands consommateurs (Reilly et al. 1998). En population générale, environ 20 % des utilisateurs réguliers présentent des troubles anxieux (Reilly et al. 1998). **La consommation de cannabis chez les adolescents multiplie par 2 le risque d'apparition de ces troubles à l'âge adulte**, surtout s'il est consommé précocement avant l'âge de 15 ans. Les filles semblent plus sujettes à l'apparition de ces troubles (Hayatbakhsh et al. 2007; Patton et al. 2002). L'attaque de panique et le syndrome de dépersonnalisation sont les troubles anxieux les plus souvent rapportés.

- L'attaque de panique

Aussi appelée « crise d'angoisse aiguë » et, plus familièrement, « bad trip », l'attaque de panique se traduit par une bouffée d'angoisse paroxystique de survenue brutale pouvant durer jusqu'à plusieurs heures. Elle est liée au contexte et à l'état émotionnel du sujet au moment de la prise ainsi qu'à la qualité du cannabis. Les principaux symptômes psychiques sont la peur, l'angoisse voire, une réelle terreur. L'esprit est envahi par des pensées catastrophiques : peur de s'évanouir, d'étouffer et d'avoir un accident cardiaque, peur de perdre le contrôle de soi, de mourir. Les signes physiques les plus fréquents concernent la respiration (polypnée, dyspnée, sensation d'étouffement ou de blocage respiratoire) et le rythme cardiaque (palpitations, tachycardie). Les symptômes généraux sont des étourdissements, des vertiges, des sueurs, des bouffées de chaleur ou des frissons, des tremblements et des secousses musculaires. Un traitement par des benzodiazépines permet de traiter tous ces symptômes.

- Le syndrome de dépersonnalisation

Ce syndrome est un trouble anxieux généralisé qui débute de façon brutale et dure de quelques semaines à plusieurs mois. Le consommateur de cannabis ressent un sentiment d'étrangeté, de dépersonnalisation « je ne sais plus qui je suis » ou de déréalisation (sensation de modification de l'environnement). Une grande fatigue et une humeur dépressive accompagne ces symptômes. Le traitement par des anxiolytiques ou des antidépresseurs peut être nécessaire. Un suivi par un psychothérapeute est recommandé.

2. Cannabis et troubles dépressifs

Des études ont montré des liens entre consommation chronique de cannabis et états dépressifs majeurs et/ou tentatives de suicide (Chabrol et al. 2008; Fergusson et al. 2002). Chez les consommateurs de cannabis, en population générale, la fréquence des troubles dépressifs sur la vie entière est de 25 % dont 14 % de dépression majeure et 11 % de troubles sévères de l'humeur. **Le risque augmenterait avec la sévérité et avec la précocité de la consommation (avant l'âge de 15 ans)**. En effet, l'abus de cannabis chez l'adolescent multiplie par 5 le risque de développer à long terme des troubles dépressifs. Cette relation est encore plus forte chez la femme (Grant and Pickering 1998; Green and Ritter 2000).

Une étude longitudinale sur 2033 Norvégiens suivis pendant 13 ans a montré une association dose-dépendante entre la consommation chronique de cannabis et les idées suicidaires à long terme (Pedersen 2008).

Cependant, la relation entre cannabis et dépression reste encore controversée. Les recherches suggèrent qu'il existerait un terrain génétique prédisposant à un état dépressif et qui serait précipité par l'usage précoce de cannabis (Lynskey et al. 2004; Vinod and Hungund 2006).

3. Cannabis et syndrome amotivationnel

Cet état amotivationnel que l'on retrouve souvent chez les consommateurs réguliers de cannabis, regroupe généralement un déficit de l'activité, un ralentissement intellectuel, de l'apathie, des déficits attentionnels, une diminution d'intérêt pour le monde extérieur, un repli sur soi et parfois de l'incurie (Laqueille 2005).

4. Cannabis et psychose cannabique

Si la psychose cannabique est peu fréquente dans les pays à forte consommation (Inde, Afrique, Antilles), il s'agit néanmoins de l'un des motifs d'hospitalisation psychiatrique les plus fréquents. Ce sont des épisodes brefs, avec une évolution de quelques jours à plusieurs mois. Ils peuvent survenir brutalement chez des consommateurs réguliers sans trouble manifeste et sont généralement précipités par un facteur psychologique ou somatique. La sémiologie de la psychose cannabique regroupe des troubles du comportement tels que : des hallucinations visuelles, un sentiment de persécution, de la confusion, de l'agressivité, des délires à thèmes polymorphes, une désorientation temporo-spatiale. Ce tableau doit faire poser la question d'un mode d'entrée dans la schizophrénie. Le traitement par un antipsychotique est préconisé pour diminuer ces troubles (Laqueille et al. 2008).

5. Cannabis et troubles schizophréniques

Cette occurrence pose beaucoup de questions étiopathogéniques puisqu'on pense que **le cannabis serait un facteur de développement ou d'aggravation de ces troubles**. Cette question est plus que jamais à l'ordre du jour devant l'accroissement de la consommation de cannabis en population générale mais aussi en population schizophrène.

a. Fréquence de la comorbidité associant consommation de cannabis et schizophrénie

La prévalence de l'abus ou de la dépendance au cannabis dans les services de psychiatrie est particulièrement élevée chez les patients schizophrènes puisqu'elle est comprise entre 13 et 42 % sur la vie entière et entre 8 et 22 % pour les 6 mois précédant l'étude (Duaux and Dervaux 2000). A l'inverse, la prévalence des troubles schizophréniques dans une population présentant un diagnostic d'abus ou de dépendance d'après les critères de la quatrième édition du Manuel Diagnostique et Statistique des troubles mentaux (DSMIV) est de 6 %, avec un risque multiplié par 4,8 de développer une psychose.

b. Le cannabis : facteur de risque pour le développement de la schizophrénie ?

Le cannabis est-il la cause ou la conséquence du développement de la maladie ?

La schizophrénie est un trouble psychiatrique sévère dont le profil clinique et étiologique est hétérogène et fort complexe. C'est un syndrome physiopathologique plurifactoriel, débutant souvent à l'adolescence (parfois même avant) ou chez le jeune adulte et évoluant vers une « dissociation » progressive de la personnalité.

On peut classer les symptômes selon 3 grandes classes :

Les symptômes positifs comprennent les anomalies psychiques et comportementales « productives ». Ils incluent des hallucinations, des idées délirantes, des troubles de la pensée ainsi qu'une agitation motrice.

Les symptômes négatifs regroupent des déficits de communication, des troubles du langage (alogie), un retrait social, une dysharmonie affective, une difficulté à éprouver du plaisir (anhédonie), un manque de motivation à effectuer une activité, une difficulté à développer un comportement organisé (avolition) et des négligences de l'hygiène (incurie).

Les symptômes cognitifs concernent les déficits de la mémoire de travail, de la mémoire à court terme et de la mémoire sémantique, les déficits de la vigilance, de l'attention et du raisonnement. Ils incluent également les déficits de filtrage des informations sensorimotrices qui impliquent des fonctions pré-attentionnelles cognitives dont l'intensité est en rapport avec l'étendue des symptômes positifs (délires et hallucinations).

Les patients peuvent également présenter des troubles de l'humeur, de l'anxiété, des manifestations anxieuses et des symptômes catatoniques.

Les schizophrènes consommeraient du cannabis dans un but d'automédication, pour améliorer leurs troubles de l'humeur, pour soulager leur anhédonie et leur anxiété ou pour contrer les effets indésirables de leurs traitements par neuroleptiques. En 1992, Peralta et

Cuesta ont comparé 23 sujets schizophrènes de moins de 35 ans abusant ou dépendant du cannabis et 72 schizophrènes non consommateurs de cette drogue et ont mis en évidence que les patients non consommateurs de cannabis présentaient plus de symptômes négatifs, de retrait social et d'alogie que les patients abusant de la substance (Peralta and Cuesta 1992). Ceci suggère que le cannabis atténuerait certains symptômes négatifs de la schizophrénie.

Cependant, une étude menée en 1997 montre que l'usage de cannabis chez les patients schizophrènes est corrélé aux idées délirantes, aux hallucinations, à la dépression et que plus la consommation est élevée, plus les symptômes sont importants (Brunette et al. 1997). De plus, les consommateurs schizophrènes présenteraient des comportements antisociaux, une moindre compliance aux traitements, des difficultés relationnelles, une aggravation des tendances dépressives et des idées suicidaires ainsi que des troubles cognitifs plus accentués comparés aux patients non consommateurs (Bennett et al. 2001; Brunette et al. 1997; Caspari 1999; Cleghorn et al. 1991; D'Souza et al. 2005; Dixon 1999; Gut-Fayand et al. 2001). Ainsi, **sur le plan clinique, le cannabis semble exacerber les symptômes positifs, négatifs et cognitifs de la schizophrénie.** Chez les schizophrènes, la consommation accroît régulièrement l'incidence des rechutes psychotiques et les hospitalisations des patients (Martinez-Arevalo et al. 1994) et son abus précède la psychose 2 fois sur 3 (Dervaux et al. 2003; Dixon et al. 1991; Fowler et al. 1998; Khantzian 1997). De même, des patients schizophrènes consommant et abusant du cannabis consultent pour des troubles psychotiques un an avant des patients schizophrènes non consommateurs (Linszen et al. 1994). A partir de ces observations, il a été suggéré **l'hypothèse pharmacopsychotique** selon laquelle le trouble schizophrénique serait secondaire à la consommation de cannabis et que celui-ci jouerait **le rôle de catalyseur dans le déclenchement de la pathologie.** Il faut d'abord rappeler que la consommation de cannabis entraîne des manifestations s'approchant des symptômes de la schizophrénie. En effet, les troubles cognitifs liés à la consommation aiguë ou chronique évoquent les symptômes cognitifs des patients schizophrènes ; les troubles amotivationnels et anhédoniques rappellent les symptômes négatifs tandis que les symptômes positifs se rapprochent de ceux retrouvés dans la schizophrénie. Pour appuyer cette hypothèse, citons l'expérience de D'souza, menée sur des sujets sains montrant qu'une injection de THC provoque des symptômes positifs et négatifs apparentés à ceux de la schizophrénie mais également des altérations de la perception, de l'anxiété, de l'euphorie et des troubles cognitifs (faibles performances dans les tests de fluence verbale, altération de la mémoire de travail et de rappel) (D'Souza et al. 2004). Ces dernières années, les conséquences liées à une consommation chronique de cannabis ainsi que la forte consommation chez les adolescents, ont amené les chercheurs à établir un lien entre la consommation de cannabis à l'adolescence et l'augmentation du risque à développer, plus tard dans la vie, des troubles schizophréniques. Dans les années 80, une première étude longitudinale initiée sur une population de 8483 Suédois âgés de 18 ans et indemnes de toute psychopathologie montre, 15 ans plus tard, sur cette même population, un risque accru (2,4) de développer des troubles apparentés à ceux de la schizophrénie chez les personnes ayant consommé du cannabis (à plus de 10 occasions) par rapport aux non consommateurs. Ce risque est multiplié par 2 lorsque la consommation est supérieure à 50 prises. Cette même analyse, sur l'ensemble des 45000 conscrits, indique un risque multiplié par 6 par rapport aux non consommateurs. Dans tous les cas, les troubles schizophréniques

semblaient survenir de façon brutale. D'après les auteurs, **la consommation de cannabis pourrait être un facteur de risque pour le développement de la schizophrénie** (Andreasson et al. 1987).

D'autres analyses ont conduit à des résultats semblables. Ainsi, une grande étude longitudinale a été menée pendant 11 ans sur 759 sujets ne présentant aucune psychose préexistante et a rapporté que la consommation de cannabis est associée à un risque accru d'apparition de symptômes schizophréniques (Arseneault et al. 2002). Cette étude montre aussi que l'usage précoce de cannabis (avant l'âge de 15 ans) multiplie par 4 le risque de développer ces troubles à l'âge de 26 ans, comparativement à une consommation débutée après 18 ans. Pour les auteurs, **8 à 13% des patients ne seraient pas devenus schizophrènes s'ils n'avaient pas consommé du cannabis** (Arseneault et al. 2004). Cette forte association a été confirmée par une autre étude montrant que les symptômes psychotiques positifs et négatifs étaient plus fortement associés à un premier usage débutant avant l'âge de 16 ans plutôt qu'après, ceci indépendamment de la durée et de la fréquence d'exposition (Stefanis et al. 2004). L'argument, souvent avancé, de l'automédication n'explique pas l'association entre consommation de cannabis à l'adolescence et développement de psychoses à l'âge adulte puisque celle-ci s'observe plutôt en l'absence de détresse psychologique plutôt qu'en sa présence (Henquet et al. 2005).

Cependant, seule une petite minorité de consommateurs est susceptible de développer des psychoses, les facteurs environnementaux et les prédispositions génétiques jouant également un rôle dans cette association.

c. Bases neurobiologiques de l'association entre consommation de cannabis et schizophrénie

- Récepteurs cannabinoïdes

Des facteurs neurobiologiques communs supportent l'hypothèse pharmacopsychotique. Les **RCB1 étant localisés dans des régions cérébrales fortement impliquées dans la physiopathologie de la schizophrénie** (CPF, hippocampe, ATV, ganglions de la base) (Howlett 2002) et leur activation agissant sur les transmissions dopaminergiques (DAergique) et glutamatergiques, les scientifiques ont naturellement pensé à une dysrégulation commune du système endoCB (Emrich et al. 1997). Des analyses post-mortem de patients schizophrènes ont montré des augmentations de la densité des RCB1 dans le CPF dorsolatéral et le cortex cingulaire (antérieur et postérieur) de ces patients (Dean et al. 2001; Newell et al. 2006; Zavitsanou et al. 2004). Une diminution du volume de la matière grise dans le cortex cingulaire postérieur a également été mise en évidence chez des patients schizophrènes abusant du cannabis comparés à des patients non consommateurs (Bangalore et al. 2008). Ces données renforcent l'idée que la modulation du système endoCB dans le CPF et le cortex cingulaire pourrait jouer un rôle dans la perturbation des fonctions cognitives des patients schizophrènes.

- Endocannabinoïdes

Des modifications de la concentration en endoCB, notamment celle de l'anandamide, sont également observées dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients schizophrènes, par

rapport à des patients non schizophrènes, et ceci indépendamment d'une consommation récente de cannabis (Leweke and Emrich 1999; Leweke et al. 1999). Ce taux est très élevé chez des schizophrènes paranoïdes non traités présentant un premier épisode psychotique et est inversement proportionnel à l'importance des symptômes observés (Giuffrida et al. 2004). Les concentrations en anandamide tendent à revenir à la normale lorsque les patients sont traités par des antipsychotiques classiques (antagonistes des récepteurs DAergiques D2). La schizophrénie paranoïde est principalement caractérisée par des symptômes positifs prédominants résultant d'une augmentation de la neurotransmission DAergique (Oades et al. 2002). Ainsi, cette augmentation des taux d'anandamide pourrait être liée aux mécanismes de régulation homéostatique des endoCB et de leur synthèse « à la demande » pour contrer les hauts niveaux de DA. Une autre étude du même groupe a montré que les taux d'anandamide contenu dans le LCR de patients schizophrènes non traités sont nettement moins élevés (10 fois moindre) chez des patients abusant du cannabis comparativement à des patients témoins ou ayant consommé du cannabis à faible fréquence (moins de 5 fois) (Leweke et al. 2007). Ces résultats indiquent que l'exposition fréquente au cannabis induirait une « down-régulation » de la signalisation de l'anandamide dans le SNC de patients schizophrènes mais pas chez des patients sains ou consommant peu de cannabis. Cette « down-regulation » de l'anandamide entraînerait une perte de son contrôle sur la régulation de la neurotransmission DAergique et précipiterait la psychose. Une **altération de la signalisation du système endoCB pourrait être une composante importante des mécanismes sous-jacents à l'impact des cannabinoïdes sur la santé mentale.**

- Vulnérabilité au cannabis

Les études de la vulnérabilité génétique des effets délétères à long terme du cannabis montrent qu'un polymorphisme du gène *CNR1* codant pour le RCB1 serait associé à un risque accru de développement de schizophrénie hébéphrénique dans une population Japonaise (Ujike et al. 2002). Ce type de schizophrénie est caractérisé par des symptômes négatifs prédominants ressemblant aux troubles amotivationnels souvent retrouvés après une consommation chronique de cannabis, appuyant l'idée d'une altération du système endoCB dans ce type de schizophrénie. Une étude plus récente a corrélé l'existence de plusieurs polymorphismes génétiques du gène *CNR1* à des diminutions du volume de la matière blanche dans le cortex frontal et temporal et à des déficits cognitifs chez des patients schizophrènes. Cette observation est aussi mise en évidence chez des grands consommateurs de cannabis, suggérant l'existence d'une vulnérabilité génétique associée au risque de développer une schizophrénie (Ho et al. 2011). Par contre, le polymorphisme du gène de la catéchol-O-méthyltransférase (COMT), qui joue un rôle critique dans le catabolisme de la DA, freine l'influence de la consommation de cannabis chez les adolescents à développer une psychose à l'âge adulte. Les porteurs de l'allèle COMT valine 158 seraient plus susceptibles de présenter des symptômes psychotiques et de développer des troubles schizophréniques s'ils ont consommé du cannabis. A l'inverse, la consommation de cannabis n'a pas une telle influence défavorable sur une personne possédant deux copies de l'allèle méthionine (Caspi et al. 2005). L'augmentation de l'activité de la COMT serait responsable d'une diminution des taux de DA contribuant au développement des déficits cognitifs (Chen et al. 2004).

L'ensemble de ces travaux semble établir que la consommation de cannabis, notamment lors de l'adolescence, participe au développement à long terme de troubles schizophréniques chez des personnes génétiquement vulnérables.

III. Les effets comportementaux induits par l'exposition aux cannabinoïdes chez l'animal

Les modèles animaux visent à reproduire des troubles neurophysiologiques et comportementaux semblables à ceux observés en clinique. Ils permettent de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu pour l'étude d'une pathologie et peuvent contribuer ainsi au développement de nouvelles thérapies.

A. Exposition aiguë aux cannabinoïdes

Chez le rongeur, les agonistes cannabinoïdes induisent l'apparition de nombreux comportements dont l'analgésie (Pertwee 2001; Varvel et al. 2005), l'hypothermie (Monory et al. 2007), la catalepsie et l'hypolocomotion (El Manira and Kyriakatos 2010; Martin et al. 1987). Le rôle primordial des RCB1 dans ces différents comportements est confirmé par leur abolition chez les souris KO pour les récepteurs CB1 (Ledent et al. 1999; Zimmer et al. 1999) et après administration d'antagoniste de ces mêmes récepteurs (Compton et al. 1996; Rinaldi-Carmona et al. 1994).

Des déficits de la mémoire à court terme et de la mémoire de travail sont également observés après une simple injection d'agoniste RCB1 (Mishima et al. 2002; Schneider et al. 2008) et semblent plus prononcés après administration durant l'adolescence chez le Rat (Schneider et al. 2008).

Malgré la forte consommation de cannabis chez les adolescents, les études expérimentales des conséquences à long terme chez l'animal sont rares, et se sont principalement développées au cours de la dernière décennie. C'est ce que nous aborderons dans le prochain paragraphe.

B. Exposition chronique aux cannabinoïdes durant l'adolescence

La mise au point d'un modèle animal d'exposition au cannabinoïdes durant l'adolescence chez le Rat est fondamental pour l'étude des conséquences à long terme d'une consommation au cannabis chez l'adolescent. Ces études devraient permettre d'améliorer notre compréhension des mécanismes neurobiologiques sous-jacents aux effets délétères à long terme du cannabis pendant cette période chez l'Homme. Certains troubles apparentés aux pathologies psychiatriques peuvent être étudiés par l'utilisation de **tests comportementaux** connus et validés.

1. Tests comportementaux utilisés pour la recherche des comportements anormaux en relation avec les pathologies psychiatriques

a. Evaluation des performances cognitives

Le test de la reconnaissance d'objets permet d'évaluer les mémoires à court terme ou à long terme de l'animal (selon l'intervalle de rétention utilisé). Ce test est basé sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer préférentiellement la nouveauté. Il consiste à comparer le temps d'exploration d'un nouvel objet à celui d'un objet familier (Ennaceur and Delacour 1988). La préférence de l'animal pour un nouvel objet permet d'estimer le fonctionnement de la mémoire à court terme (délai entre apprentissage et test entre 15 min et plusieurs heures) ou à long terme (délai entre 24h et 48h). Nous détaillerons ce test dans la partie Matériel et Méthodes.

La piscine de Morris ou "Morris water maze" permet d'évaluer les capacités à mémoriser l'information spatiale chez l'animal dans une situation aversive. Ce test repose sur la tendance naturelle présentée par un animal qui, placé dans un environnement stressant, tente de s'en échapper en localisant, à l'aide des indices distaux, une plate-forme « refuge » invisible par immersion dans un bassin rempli d'eau opacifiée. Suivant le protocole utilisé, le dispositif permet d'évaluer **la mémoire de référence** (la plate-forme reste à la même place à chaque jour de test) ou **la mémoire de travail** (la plate-forme change de place d'un jour à l'autre). Le temps de latence pour atteindre la plateforme, le temps de présence et la distance parcourue dans chacun des quadrants sont les variables permettant d'évaluer les performances cognitives des animaux. Les capacités motrices d'un animal peuvent aussi être évaluées par la distance totale parcourue.

Le labyrinthe radial est composé de 8 bras dans lesquels de la nourriture est déposée à leur extrémité. L'animal est placé sur la plate-forme centrale et doit visiter une seule fois un bras appâté et ne pas y retourner. Ce test fait intervenir **la mémoire de référence** (stockage à long terme des informations spatiales) **et la mémoire de travail**. Grâce aux indices spatiaux placés dans la pièce, l'animal utilisera sa mémoire de référence pour localiser les bras à visiter. La mémoire de travail lui permettra de garder en mémoire les bras visités pour ne pas y retourner.

b. Evaluation de la dimension psychotique

Le test de **l'inhibition de la réponse réflexe de sursaut (PPI pour PrePulse Inhibition)** est une mesure opérationnelle du filtrage sensorimoteur témoignant des capacités à réguler les informations sensorielles. Les patients schizophrènes présentent parfois des déficits du filtrage des informations sensorielles (Braff et al. 2001a; Braff et al. 2001b) qui seraient à l'origine de l'étendue des délires et hallucinations (symptômes positifs). Le principe est le suivant : un individu soumis à un fort stimulus sonore (pulse) va sursauter. Si ce pulse est précédé par un autre stimulus sonore d'intensité plus faible (prépulse), l'amplitude de sursaut sera diminuée : ce phénomène est appelé inhibition par le prépulse sonore de la réaction de sursaut. Chez le Rat on mesure de façon automatisée l'amplitude de la réponse réflexe (constituée de sursauts) et sa latence (c'est à dire le délai entre le stimulus et le pic de la réponse).

c. Evaluation des comportements sociaux

Le test d'interaction sociale mesure les comportements sociaux entre animaux. L'analyse de la fréquence des rencontres ainsi que la durée de celles-ci entre paires de même sexe et de même âge permet d'estimer la qualité et la quantité des événements d'interaction entre paires. Ce test permet aussi de mesurer le niveau d'anxiété de l'animal.

d. Evaluation du comportement moteur

Le test du Champ Ouvert ou « Open field » permet de mesurer les déplacements de l'animal placé dans un nouvel environnement. En plus des informations sur l'activité locomotrice, ce test permet d'évaluer le niveau d'anxiété de l'animal. Les variables mesurées sont généralement l'activité ambulatoire totale, le nombre de redressements ainsi que le nombre d'entrées et le temps passé dans l'aire centrale.

e. Evaluation de la dimension dépressive

Le test de Porsolt ou test de la nage forcée (FST) est un test qui permet généralement d'évaluer le pouvoir prédictif d'une molécule de type antidépresseur. Il consiste à placer les rongeurs (rats ou souris) dans un récipient cylindrique contenant de l'eau à 25°C. L'animal, placé dans cet environnement stressant et confiné, va d'abord tenter de s'en échapper en se débattant puis va se laisser flotter, restant immobile. Seuls quelques petits mouvements des pattes postérieures lui permettront de garder la tête hors de l'eau : ce comportement est qualifié de « **comportement désespoir** » et permet d'évaluer le comportement dépressif d'un animal par l'analyse du temps passé par celui-ci en immobilité.

f. Evaluation de l'anxiété

Le labyrinthe en croix surélevée ou Elevated Plus Maze (EPM) est le test généralement utilisé pour détecter un comportement de type **anxieux**. Le labyrinthe est constitué de 2 bras ouverts et de 2 bras fermés reliés par une plate-forme centrale. Un animal anxieux passera plus de temps dans les bras fermés. Les paramètres tels que le nombre d'entrées dans les bras fermés et ouverts ainsi que le temps passé dans les 4 bras sont mesurés.

2. Etudes des conséquences à long terme d'une exposition aux cannabinoïdes durant l'adolescence chez le Rat

Les données concernant les conséquences à long terme d'une exposition au cannabinoïdes durant l'adolescence chez le Rat sont peu nombreuses et pas toujours concordantes. Elles dépendent du composé cannabinoïde administré, du protocole de traitement, du test comportemental utilisé et de la période pendant laquelle le composé cannabinoïde est administré. La période de l'adolescence chez le Rat est une période encore débattue. Comme l'attestent les différentes études, cette période n'est pas précisément définie. Pour certains auteurs elle s'étend du 28^{ème} au 38^{ème} JPN (Higuera-Matas et al. 2009) ou du 30^{ème}

au 51^{ème} JPN (Cha et al. 2006; O'Shea et al. 2004) et pour d'autres auteurs, cette période commencerait plus tardivement, pour s'étendre jusqu'à la frontière avec l'âge adulte du 40^{ème} au 65^{ème} JPN (Schneider and Koch 2003; Wegener and Koch 2009).

Les différents résultats comportementaux issus de la littérature sur les conséquences à long terme d'une exposition aux cannabinoïdes durant l'adolescence chez le Rat sont regroupés dans le tableau ci-dessous (Tableau 4).

Comportement	Drogue utilisée	Période de traitement	Souche de rats	Sexe	Test	Déficit modélisé	Effets à l'âge adulte	Correlats neurochimiques	Références
Psychose	WIN55,212-2 (1,2 mg/Kg)	JPN 40-65 (façon irrégulière)	Wistar	♂	Prepulse inhibition	filtrage des informations sensorielles	Altération	/	Schneider and Koch (2003)
								Imunoréactivité de FOS altérée dans Nac,mCPu, DG	Wegener and Koch (2009)
Cognition	CP-55,940 (0,15/0,20/0,30 mg/kg)	JPN 30-51	Wistar	♀♂	Reconnaissance d'objets	Mémoire à court terme	Altération	/	O'Shea et al. (2004,2006)
	WIN55,212-2 (1,2 mg/Kg)	JPN 40-65 (façon irrégulière)	Wistar	♂	Reconnaissance d'objets	Mémoire à court terme	Altération	/	Schneider and Koch (2003,2007)
	Δ9-THC (5 mg/kg)	JPN 30-51	Sprague Dawley	♀♂	Piscine de Morris	Mémoire de travail et mémoire de référence	Pas d'effets	/	Che et al. (2006,2007)
	Δ9-THC (2,5-5-10 mg/kg)	JPN 35-45	Sprague Dawley	♂	Labyrinthe à 8 bras	Mémoire de travail et mémoire de référence	Altération de la mémoire de travail spatiale	↘ de la densité des RCB1 dans Amyg ↘ de la fonction RCB1 dans l'hippocampe, altérations de la morphologie neuronale dans DG	Rubino et al. (2009a)
				♀				Modification d'expression de marqueur de plasticité synaptique, de protéines mitochondriales et du cytosquelette dans le CPF	Rubino et al. (2009b)
	Δ9-THC (5 mg/kg)	JPN 32-48 (façon irrégulière)	Wistar	♂	Reconnaissance d'objets	Mémoire à court terme	Altération	Altérations de l'expression de protéines de stress oxydatif mitochondriales, de protéines du cytosquelette, de protéines du métabolisme et de signalisation cellulaire dans l'hippocampe	Quién et al. (2008)
CP-55,940 (0,4 mg/kg)	JPN 28-38	Wistar	♀♂	Piscine de Morris	Mémoire de travail et mémoire de référence	Pas d'effets	LTP mesurée niveau CA1 inchangée mais ↗PSA-NCAM hipp chez ♂ seulement	Higuera-Matas et al. (2009)	
Emotions	CP-55,940 (0,4 mg/kg)	JPN 35-45	Wistar	♂	Open Field	Activité locomotrice /Anxiété	Pas d'effets	Pas de modifications dans les concentrations de corticostérone plasmatique à l'âge adulte	Bisoca et al. (2003)
				♀	Labyrinthe en croix surélevée	Anxiété	Effet anxiolitique		
	Δ9-THC (5 mg/kg)	JPN 32-48 (façon irrégulière)	Wistar	♂	Test de l'interaction sociale	Comportements sociaux/ Anxiété	Altération	Altérations de l'expression de protéines de stress oxydatif mitochondriales, de protéines du cytosquelette, de protéines du métabolisme et de signalisation cellulaire dans l'hippocampe	Quién et al. (2008)
	Δ9-THC (2,5-5-10 mg/kg)	JPN 35-45	Sprague Dawley	♀	Test de la nage forcée	Troubles dépressifs	↗comportement dépressif	↘ de la densité et de la fonction des RCB1 dans Nacc,Amy, ATV/ ↘ de pCREB dans hipp, CPF et ↗ de pCREB dans Nacc	Rubino et al. (2008)
	CP-55,940 (0,4 mg/kg)	JPN 28-38	Wistar	♀♂	Labyrinthe en croix surélevée	Anxiété	Effet anxiolitique	Pas de modifications dans les concentrations de corticostérone plasmatique à l'âge adulte	Higuera-Matas et al. (2009)
CP-55,940 (0,15/0,20/0,30 mg/kg)	JPN 30-51	Wistar	♀♂	Test de l'interaction sociale	Comportements sociaux/ Anxiété	↗comportement anxieux	/	O'Shea et al. (2004,2006)	

Tableau 4 : Les différents modèles animaux utilisés pour l'étude des conséquences à long terme d'une exposition aux cannabinoïdes durant l'adolescence chez le Rat. NAcc : Noyau Accumbens ; DG : Gyrus Denté, Amyg : Amygdale ; ATV : Aire tegmentale ventrale ; CPF : Cortex préfrontal. Toutes les études comportementales commencent entre 28 jours et 30 jours après la dernière injection avec l'agoniste, période

qui correspond à une période de sevrage, sauf pour l'étude de Schneider et Koch où cette période est réduite à 10 jours.

a) Evaluation des performances cognitives

L'exposition chronique à des doses quotidiennes et croissantes de l'agoniste CB1, le CP55, 940 chez des rats Wistar de JPN30 à 50 entraîne des déficits de mémoire de travail chez les femelles et les mâles testés à l'âge adulte dans le test de la reconnaissance d'objets (O'Shea et al. 2006; O'Shea et al. 2004). Les mêmes déficits sont retrouvés chez des rats mâles traités de façon irrégulière avec un autre agoniste des RCB1, le WIN55,212-2 de JPN40 à 65 (Schneider and Koch 2003; 2007). Dans le test de la piscine de Morris, les résultats sont plus variables. En effet, des rats traités avec du CP55, 940 (0.4 mg/kg) du 28^{ème} au 38^{ème} JPN ne présentent pas de déficits de la mémoire de travail ni de la mémoire de référence dans ce test à l'âge adulte bien que les auteurs montrent des modifications d'expressions de la glycoprotéine de la molécule d'adhésion des cellules neuronales (NCAM) dans l'hippocampe (Higuera-Matas et al. 2009). Des résultats similaires sont obtenus avec des protocoles d'injections chroniques du Δ 9-THC : des rats mâles et femelles exposés durant 21 jours de JPN 30 à 50 à une dose de 5mg/kg et testés à l'âge adulte dans la piscine de Morris ne présentent pas de déficits de la mémoire de travail ni de la mémoire de référence (Cha et al. 2006). A l'inverse, la même dose de THC délivrée du 32^{ème} au 48^{ème} JPN altère la mémoire à court terme dans le test de la reconnaissance d'objets (Quinn et al. 2008). Dans cette dernière étude les auteurs montrent que des protéines impliquées dans la régulation du stress oxydatif et dans le fonctionnement et la cytoarchitecture mitochondriale sont différemment exprimées dans l'hippocampe des rats traités au Δ 9-THC durant l'adolescence comparativement à des rats adolescents non traités. De même, des rats traités avec des doses croissantes de THC (2.5 ; 5 et 10 mg/kg) du 35^{ème} au 45^{ème} JPN présentent à l'âge adulte des déficits de la mémoire de travail spatiale dans le labyrinthe radial. Les auteurs ont corrélé ces déficits à une diminution des marqueurs de plasticité synaptique telles que la synaptophysine, la PSD95 dans l'hippocampe de même qu'une réduction des niveaux d'expression des récepteurs NMDA et de la GFAP (protéine acide fibrillaire gliale) (Rubino et al. 2009). L'arborisation dendritique totale et la densité des épines dendritiques des neurones dans le gyrus denté sont significativement réduites comparées à des animaux non traités (Rubino et al. 2009). Le même traitement administré chez les rattes provoque également des modifications d'expression de la synaptophysine et de la PSD95 mais dans le CPF et pas dans l'hippocampe.

L'ensemble de ces données montre que l'exposition aux cannabinoïdes durant l'adolescence entraîne à long terme des déficits de mémoire ainsi que des modifications dans l'expression de protéines importantes pour la plasticité synaptique dans l'hippocampe et le CPF.

b) Evaluation du filtrage sensorimoteur

Des rats mâles exposés de façon irrégulière au WIN55, 212-2 du 40^{ème} au 65^{ème} JPN présentent des déficits du filtrage des informations sensorielles mesurés dans le test du PPI, 10 jours après l'arrêt du traitement (Schneider and Koch 2003; Wegener and Koch 2009). Ces résultats ont pu être corrélés avec des altérations de l'activité neuronale basale (activité c-FOS) dans le Nacc, l'amygdale, le caudé-putamen et l'hippocampe (Wegener and Koch

2009). Il est à noter que seule cette équipe a mis en évidence de tels déficits à long terme du PPI.

c) Evaluation de troubles anxieux

Une administration chronique de CP55, 940 (0.4 mg/kg) chez des rats du 35^{ème} au 45^{ème} JPN ou du 28^{ème} au 38^{ème} JPN provoque chez ces animaux testés à l'âge adulte des effets anxiolytiques dans le test du labyrinthe en croix surélevée (Biscaia et al. 2003; Higuera-Matas et al. 2009). Aucune modification dans les concentrations en corticostérone plasmatique n'est cependant retrouvée chez ces rats adultes, suggérant une activité « normale » de l'axe Hypothalamo-Hypophyse-corticosurrénales (HPA). A l'inverse, d'autres auteurs ont mis en évidence des troubles anxieux à long terme mesurés dans le test de l'interaction sociale après un traitement chronique par le THC (de JPN 32 à 48) (Quinn et al. 2008) et le CP55, 940 (de JPN 30 à 51) (O'Shea et al. 2004).

d) Comportement de résignation

Des rattes exposées du 35^{ème} au 45^{ème} JPN avec des doses croissantes de THC (2.5 ; 5 et 10 mg/kg) présentent un comportement de désespoir lorsqu'elles sont testées à l'âge adulte dans le test de la nage forcée (Rubino et al. 2008). En parallèle, l'expression des RCB1 mesurée dans l'amygdale, l'ATV et le Nacc est réduite dans ces régions, démontrant le rôle des RCB1 dans la régulation de la réponse émotionnelle. Ces changements s'accompagnent aussi de modifications d'expressions de la protéine CREB dans l'hippocampe, le Nacc et le CPF (Rubino et al. 2008).

Il a ainsi été mis en évidence chez l'animal exposé aux cannabinoïdes durant l'adolescence, des anomalies comportementales à long terme similaires à celles observées chez l'Homme ainsi que des altérations d'expressions protéiques dans certaines régions du SNC, notamment dans l'hippocampe, le CPF et l'amygdale.

Ces résultats suggèrent que l'apport de cannabinoïdes exogènes durant l'adolescence interfère durablement avec le fonctionnement normal des endoCB dans la **régulation de la transmission synaptique et dans la modulation de différentes fonctions du SNC, notamment, le traitement des informations nécessaires aux processus cognitifs et émotionnels**, dans les régions associées à ces différentes fonctions. Cependant, les résultats controversés qui semblent dépendre de la durée de l'exposition, du test comportemental utilisé, de l'agoniste RCB1 choisi et de la dose utilisée restent à explorer sur le plan des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents aux effets délétères des cannabinoïdes administrés durant l'adolescence.

En conclusion, les risques liés à la consommation de cannabis sont réels et constituent un défi de santé publique. Outre les conséquences immédiates, le plus préoccupant reste le risque accru de développer des maladies psychiatriques, notamment la schizophrénie plusieurs années après avoir consommé du cannabis à la période-clé de l'adolescence. Bien que le lien de causalité soit encore difficile à prouver, la plus forte concentration des produits, la fréquence et l'abaissement de l'âge de la consommation de cannabis chez les jeunes rendent urgent le développement de nouvelles stratégies de prévention.

CHAPITRE V. Objectifs de l'étude

Il ressort de cette revue bibliographique que le **système endocannabinoïde, omniprésent et fonctionnel dans le SNC** dès les phases précoces de l'ontogénèse (Chapitre I) joue un rôle essentiel dans la **régulation de la maturation fonctionnelle et structurale cérébrale**. Il contribue également significativement à la **régulation de l'excitabilité neuronale et de la plasticité synaptique** (Chapitre II). Les adolescents sont de plus en plus nombreux à consommer du cannabis dans le monde et l'âge précoce du début de l'usage, les fortes concentrations utilisées ainsi que les différents modes de consommation sont devenus préoccupants (Chapitre III). L'exposition au cannabis durant l'adolescence, grande période de maturation structurelle et fonctionnelle du néocortex et du système limbique, pourrait aboutir à des changements délétères durables de la plasticité et de l'organisation neuronale dans ces régions et favoriser le développement de certains troubles psychiatriques. Plusieurs études épidémiologiques montrent que la consommation de cannabis durant l'adolescence s'associe à **un risque accru de développer ultérieurement**, de façon «dose-dépendante», des maladies psychiatriques et plus particulièrement la **schizophrénie** (Chapitre IV). Pour anticiper ces phénomènes et gérer **les risques associés à la consommation de cannabis durant l'adolescence**, le développement de modèles animaux s'est révélé très informatif. Plusieurs travaux montrent que, chez le Rat, l'administration chronique de cannabinoïdes pendant l'adolescence entraîne des effets à long terme similaires à ceux observés en clinique (sévères déficits cognitifs, troubles de l'anxiété et troubles dépressifs). Les déficits chez l'animal semblent également dépendre de l'âge et de la durée de l'exposition (Chapitre IV) mais les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces troubles restent encore mal connus. L'objectif principal de ces travaux de thèse était de mettre au point, chez le Rat, **un modèle animal d'exposition aux cannabinoïdes en période d'adolescence afin de rechercher d'éventuelles anomalies cognitives, fonctionnelles et structurales chez ces animaux à l'âge adulte et de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents aux effets délétères des cannabinoïdes administrés durant cette période critique**. La mise au point d'un tel modèle animal repose sur (1) la période de vulnérabilité durant laquelle le traitement aux agonistes RCB1 est administré, (2) l'agoniste RCB1 et sa concentration mais aussi pourrait dépendre de (3) la souche de rats utilisée. L'adolescence chez le Rat est généralement définie comme la période qui commence environ 7 jours avant la puberté et se termine quelques jours après, soit environ du 28^{ème} au 42^{ème} JPN. Pour d'autres auteurs, cette période semble commencer plus tardivement, pour s'étendre jusqu'à la frontière avec l'âge adulte : du 40^{ème} au 65^{ème} JPN.

Une première étape dans ce projet de thèse a permis de cibler correctement la fenêtre de vulnérabilité aux cannabinoïdes durant l'adolescence chez le Rat ainsi que le type d'agoniste RCB1 à utiliser et la dose à injecter. Nous avons choisi d'administrer l'agoniste synthétique RCB1, le CP55, 940 du 29^{ème} au 50^{ème} JPN et de mesurer les conséquences cognitives à long terme sur 2 souches de rats différentes : les rats Wistar et les rats Lister Hooded. Ces deux souches présentent des sensibilités différentes aux cannabinoïdes. Les objectifs de ce projet ont consisté à évaluer (1) la performance des animaux (Wistar et Lister Hooded) exposés aux cannabinoïdes durant l'adolescence, dans des tâches de mémoire à court terme (reconnaissance d'objets) et de mémoire spatiale (localisation d'objets) à l'âge adulte (2) si

une plus grande sensibilité aux propriétés appétitives des cannabinoïdes (Wistar vs Lister Hooded) pouvait influencer les performances en mémoire observées chez ces animaux (article 1). C'est sur la souche de rats Wistar que nous avons poursuivi le projet en utilisant des approches électrophysiologiques, biochimiques et neurohistologiques. L'hypothèse formulée était que les déficits comportementaux mis en évidence à l'âge adulte suite à l'exposition aux cannabinoïdes durant l'adolescence seraient associés à des modifications structurales et/ou des altérations de la connectivité neuronale et de la plasticité synaptique (PLT) dans le CPF et plus particulièrement dans la zone de projection (aires prélimbique/infralimbique) de la région hippocampique (CA1/subiculum ventral) (article 2). Le CPF joue un rôle majeur dans les fonctions cognitives complexes (langage, conceptualisation, planification, anticipation, prise de décision, inhibition des comportements inappropriés), l'hippocampe occupe une fonction importante dans les mécanismes de la mémoire. L'interaction de l'hippocampe avec le CPF est essentielle dans différents processus de mémoire et plusieurs travaux ont récemment souligné l'importance de cette communication corticolimbique et ses dysfonctions dans plusieurs pathologies psychiatriques et dans l'étiologie de la schizophrénie. Utilisant une approche électrophysiologique, nous avons dans un premier temps, testé la plasticité des synapses hippocampo-préfrontales et complété cette étude par une analyse de la morphologie des neurones des couches II/III du CPF (technique de Golgi). Une étape ultérieure était d'identifier l'expression de marqueurs de plasticité présynaptique (synaptophysine, VGLUT3) et postsynaptique (PSD95) dans l'hippocampe et dans le CPF.

En démontrant l'importance des effets des cannabinoïdes exogènes pendant la période critique de remodelage du CPF et de l'hippocampe, ce modèle constitue un nouvel outil pour la compréhension de la pathogénèse de la schizophrénie. La caractérisation plus approfondie des effets des cannabinoïdes exogènes et de leur mécanisme d'action est indispensable pour élaborer de nouvelles thérapies qui pourraient protéger les sujets vulnérables à la psychose.

Deuxième partie

Matériel et Méthodes

A) Animaux

Dans la première étude (article 1) nous avons utilisé un total de 96 rats mâles (48 rats de souche Wistar et 48 rats de souche Lister Hooded) provenant de l'élevage Harlan (Kreuzelweg, Pays Bas) (Figure 1). Les animaux sont arrivés en 2 lots séparés :

-Lot 1 (série 1) : 24 rats Wistar et 24 rats Lister Hooded âgés de 22 JPN à leur arrivée et pesant de 74 à 122 grammes.

-Lot 2 (série 2) : 24 rats Wistar et 24 rats Lister Hooded âgés de 63 JPN à leur arrivée et pesant entre 281 et 344 grammes.

Dans la seconde étude (article 2), 3 lots différents de rats mâles Wistar ont été utilisés, l'un constitué de 48 rats (série 3), les 2 autres de 40 rats (séries 4 et 5). Les animaux provenaient de l'élevage Janvier (Le Genest-St-Isle, France). A leur arrivée, ils avaient 22 JPN et pesaient entre 81 et 125 grammes.

Tous les animaux ont été groupés (4 par cage) et hébergés à une température de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, avec un cycle jour/nuit de 12h (lumière de 7h à 19h) et un libre accès à la nourriture et à l'eau. Les animaux sont restés 5 jours en stabulation dans l'animalerie avant d'être manipulés pour les habituer à l'expérimentateur (Handling). Les expériences ont toutes été réalisées en accord avec la Réglementation Française (JO 887-848) et Européenne (86/609/EEC) concernant l'expérimentation animale.



Figure 1 : Rat de souche Lister Hooded (à gauche) et de souche Wistar (à droite).

B) Préparation et administration de la drogue

1) Préparation

Le CP55, 940 (CP ; (-)-cis-3-[2-hydroxy-4-(1,1-diméthylheptyl) phenyl]-Trans-4-(3-hydroxypropyl) cyclohexanol) (Tocris, UK) a été dissous dans du DMSO (10 % volume final), suspendu dans du Tween 80 (20% volume final) puis dilué dans une solution physiologique de NaCl 0,9% (70% volume final). La solution véhicule (VEH) ne contenait que le solvant (10% de DMSO, 20% de Tween 80 et 70% de NaCl 0.9%).

2) Administration

a) Traitement durant l'adolescence (séries 1, 3, 4 et 5)

Du 29^{ème} au 50^{ème} JPN, les rats Wistar et Lister Hooded ont reçu une injection intrapéritonéale (1ml/kg, ip) quotidienne de CP55, 940 (groupe CP) ou de son solvant (groupe VEH).

Afin d'éviter le phénomène de tolérance qui s'installerait plus rapidement sur des systèmes nerveux encore immatures, le CP a été administré selon le protocole suivant :

- De JPN 29 à 36 : 0,15 mg/kg
- De JPN 36 à 43 : 0,20 mg/kg
- De JPN 43 à 50 : 0,30 mg/kg

Les animaux ont été testés dans les tâches comportementales à l'âge adulte (JPN 77) après une période de sevrage de 28 jours. Dans les séries 1 et 3, les groupes sont constitués de 12 animaux alors que dans les séries 4 et 5, les groupes sont constitués de 10 animaux.

b) Traitement durant l'âge adulte (série 2)

Le même traitement décrit précédemment a été administré à des rats Wistar et Lister Hooded adultes du 70^{ème} au 91^{ème} JPN selon le protocole suivant :

- De JPN 70 à 77 : 0,15 mg/kg
- De JPN 77 à 84 : 0,20 mg/kg
- De JPN 84 à 91 : 0,30 mg/kg

Les animaux ont été testés dans les tâches comportementales à JPN 118, après une période de sevrage de 28 jours. Les groupes sont constitués de 12 animaux.

C) Tests comportementaux

1) Reconnaissance d'objets

a) Principe du test

Cette tâche, développée par Ennaceur et Delacour (1988), est basée sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer préférentiellement un nouvel objet par rapport à un objet familier. Ce test ne nécessite aucun entraînement préalable et ne met pas en jeu de stimulus aversif ou appétitif. Le fait de placer le rongeur dans un nouvel environnement suffit à déclencher un éveil attentionnel se traduisant par une exploration intensive. La préférence de l'animal pour un nouvel objet permet d'estimer la performance en mémoire à court terme.

b) Dispositif expérimental et protocole

Le test s'est déroulé dans un open field (80 x 80 x 50 cm). Les animaux ont été placés dans la pièce d'expérimentation 30 minutes avant le test, qui s'est déroulé en 3 phases (Figure 3) :

Une phase d'habituation au contexte : l'animal est placé au centre de l'enceinte et est libre d'explorer son environnement. Cette phase dure 3 minutes et se déroule 24h avant la phase d'acquisition (T1) du test.

Une phase d'acquisition T1 : l'animal est placé au centre de l'enceinte dans laquelle sont placés deux objets identiques. Le rat va les explorer et ils deviendront pour lui « familiers ». Cette phase permet l'acquisition de l'information et dure 3 minutes.

Une phase de test T2 : on présente à l'animal l'objet vu précédemment (objet familier) et un nouvel objet. C'est au cours de cette phase que nous évaluons la rétention de l'information après un délai d'une durée variable séparant les deux phases T1 et T2. Si le rat présente une bonne rétention des informations, il reconnaît l'objet familier et va explorer l'objet nouveau. Les différents objets utilisés ont été de forme, de couleur et de matières différentes (Figure 2).



Figure 2 : Objets utilisés dans les tests de reconnaissance d'objets et de localisation d'objets.

Les objets existent chacun en trois exemplaires, le troisième étant utilisé au cours de la phase de test T2. Ils sont soigneusement nettoyés après chaque session de rat afin d'éliminer les odeurs pouvant influencer le comportement du rat au cours du test. Pour éviter la préférence d'un objet par rapport à un autre, les objets ainsi que leur rôle (familier et nouveau) ont été permutés et randomisés entre les rats.

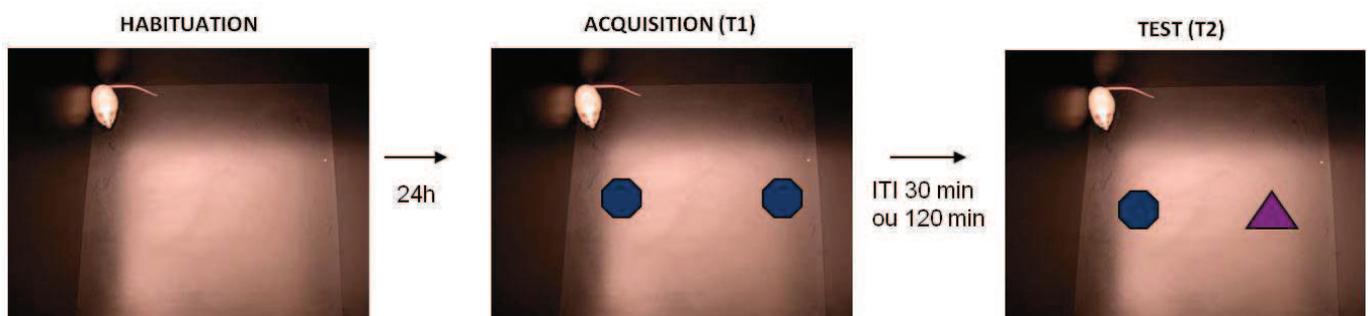


Figure 3 : Principe du test de la reconnaissance d'objets. Une phase d'habituation au contexte de 3 minutes précède de 24h le test. Durant la phase d'acquisition T1, deux objets identiques sont présentés à l'animal (objets familiers). Après un délai de rétention (ITI) de 30 minutes ou 120 minutes, l'objet familier et un nouvel objet sont présentés à l'animal.

Une séance est composée d'une phase d'habituation de 3 minutes suivie, 24h plus tard, d'une phase d'acquisition (T1) puis de test (T2), d'une durée de 3 minutes chacune. Un délai de rétention (ITI) de 30 ou 120 minutes sépare les phases T1 et T2. Seuls les rats des séries 1 et 2 ont été testés avec les 2 délais de rétention (30 et 120 min). Les rats des séries 3, 4 et 5 n'ont été testés qu'avec le délai de rétention de 30 minutes. Une période de 7 jours a séparé les séances afin d'éviter des interférences entre les différentes informations acquises. Le temps d'exploration des objets a été relevé manuellement pendant les phases T1 et T2 par l'expérimentateur situé dans une pièce adjacente. Il a été défini comme le temps pendant lequel le nez de l'animal se situe à moins de 2 cm de l'objet (Figure 4). Le fait de tourner autour de l'objet, grimper dessus ou le mordre n'est pas considéré comme de l'exploration. Le temps d'exploration du nouvel objet par rapport à celui de l'objet familier a été comparé lors de la phase T2.

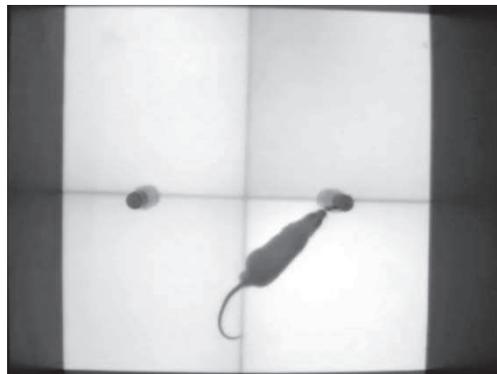


Figure 4 : Rat qui explore l'objet familier en phase d'acquisition T1 (Capture d'écran).

2) Localisation d'objets

a) Principe du test

Le principe de ce test est comparable à celui de la reconnaissance d'objets (Ennaceur and Delacour 1988; Ennaceur et al. 1997). Il s'agit ici de reconnaître une nouvelle localisation d'objets par l'utilisation d'indices spatiaux positionnés dans la pièce (Figure 5). La préférence de l'animal pour un objet placé dans une nouvelle localisation permet d'estimer la performance en mémoire spatiale (Figure 5).



Figure 5 : Pièce dans laquelle se déroulent les tests de la localisation d'objets.

b) Dispositif expérimental et protocole

Le test s'est déroulé dans un open field (80 x 80 x 50 cm). Les animaux ont été placés dans la pièce d'expérimentation 30 min avant le test qui s'est déroulé en 3 phases (Figure 6) :

Une phase d'habituation au contexte : l'animal est placé au centre de l'enceinte et est libre d'explorer son environnement. Cette phase dure 3 minutes et se déroule la veille de la phase d'acquisition (T1).

Une phase d'acquisition T1 : l'animal est placé au centre de l'enceinte dans laquelle sont placés deux objets identiques. Le rat va les explorer et leur localisation lui deviendra « familière ». Cette phase permet l'acquisition de l'information et dure 3 minutes.

Une phase de test T2 : on présente à l'animal les 2 objets dont l'un dans sa localisation familière et l'autre, dans une nouvelle localisation. C'est au cours de cette phase que nous évaluons la rétention de l'information après un délai d'une durée variable séparant les deux phases T1 et T2. Si le rat présente une bonne rétention des informations, il reconnaît l'objet placé dans sa localisation familière et va explorer l'objet placé dans sa nouvelle localisation.

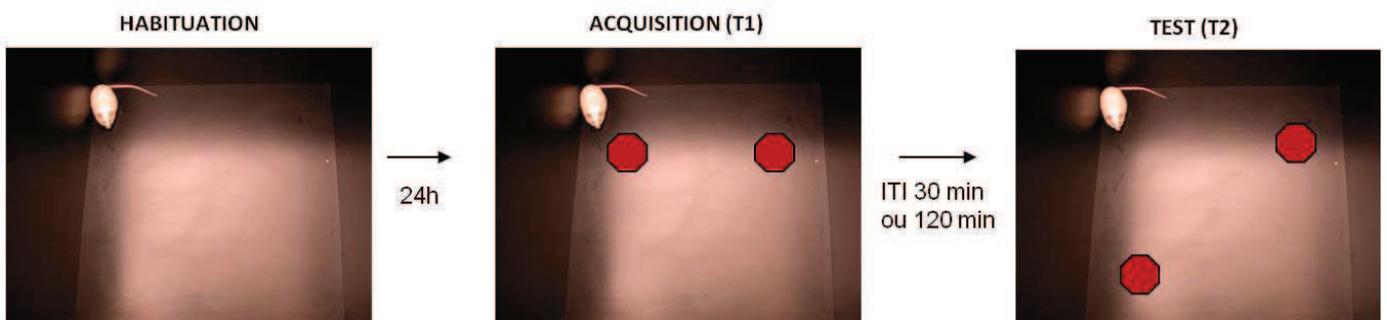


Figure 6 : Principe du test de la localisation d'objets. Une phase d'habituation au contexte de 3 minutes précède de 24h le test. Durant la phase d'acquisition T1, deux objets identiques sont présentés à l'animal dans leur localisation familière. Après un délai de rétention (ITI) de 30 minutes ou de 120 minutes, l'objet dans sa localisation familière et l'objet dans sa nouvelle localisation sont présentés à l'animal.

Une séance est composée d'une phase d'habituation de 3 minutes suivie, 24h plus tard, des phases d'acquisition (T1) et de test (T2) d'une durée de 3 minutes chacune. Un délai de rétention (ITI) de 30 ou 120 minutes sépare les deux phases. Les rats des séries 1 et 2 ont été testés avec les deux délais de rétention (30 et 120 min) et les rats des séries 3, 4 et 5 n'ont été testés qu'avec le délai de rétention de 30 min. Une période de 7 jours a séparé les séances afin d'éviter une interférence entre les différentes informations acquises. Le temps d'exploration des objets a été relevé manuellement pendant les phases T1 et T2 par l'expérimentateur situé dans une pièce adjacente. Il a été défini comme le temps pendant lequel le nez de l'animal se situe à moins de 2 cm de l'objet. Le fait de tourner autour de l'objet, grimper dessus ou le mordre n'est pas considéré comme de l'exploration. Le temps d'exploration de l'objet placé dans sa nouvelle localisation par rapport à celui de l'objet placé dans sa localisation familière a été comparé lors de la phase T2.

Dans une seconde partie d'étude, les animaux des séries 3, 4 et 5 ont été utilisés. Les rats ont été testés à l'âge adulte dans le test de la reconnaissance d'objets et la localisation d'objets (seul le délai de rétention de 30 minutes a été testé pour ces 2 tests) après un traitement au CP ou au VEH durant l'adolescence. Les animaux ont ensuite été sélectionnés selon leur performance lors de ces tests : le groupe VEH est constitué de rats « normaux » présentant de bonnes performances cognitives tandis que le groupe CP est constitué de rats présentant des déficits cognitifs dans ces tâches. Ainsi, les rats des analyses électrophysiologiques provenaient des séries 3 et 4 et ceux des analyses biochimiques (Western Blot) et neurohistologiques (Coloration de Golgi) provenaient de la série 5. Ces différentes analyses ont été réalisées tout de suite après les deux tests comportementaux, soit environ 42 jours après la fin du traitement.

D)Electrophysiologie: Potentialisation à long terme de la voie Hippocampe-Cortex préfrontal

Les animaux ont été anesthésiés avec du pentobarbital de sodium (60 mg/kg i.p) et placés dans un appareil stéréotaxique (Figure 7). La température corporelle de l'animal a été maintenue à 37°C grâce à une couverture chauffante.

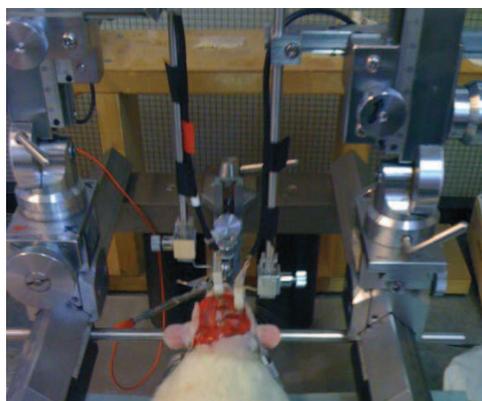


Figure 7: Rat placé dans l'appareil stéréotaxique.

Une électrode bipolaire de stimulation a été placée dans la région CA1/subiculum de l'hippocampe ventral (6,3-6,8 mm postérieur au Bregma ; 5,5 mm latéral au Bregma, profondeur 4,5-6 mm) et une électrode d'enregistrement (64 μ m de diamètre), dans l'aire prélimbique du CPF (3-3,3 mm antérieur au bregma ; 0,8 mm latéral au bregma, profondeur 3-3,4 mm). La stimulation de la région CA1 induit un potentiel de champ postsynaptique excitateur monosynaptique caractéristique que l'on enregistre dans le CPF (région prélimbique/infralimbique). La latence caractéristique du pic de la réponse hippocampe-CPF est comprise entre 18 et 22 millisecondes (Figure 8). Nous analysons l'amplitude du potentiel de champ.

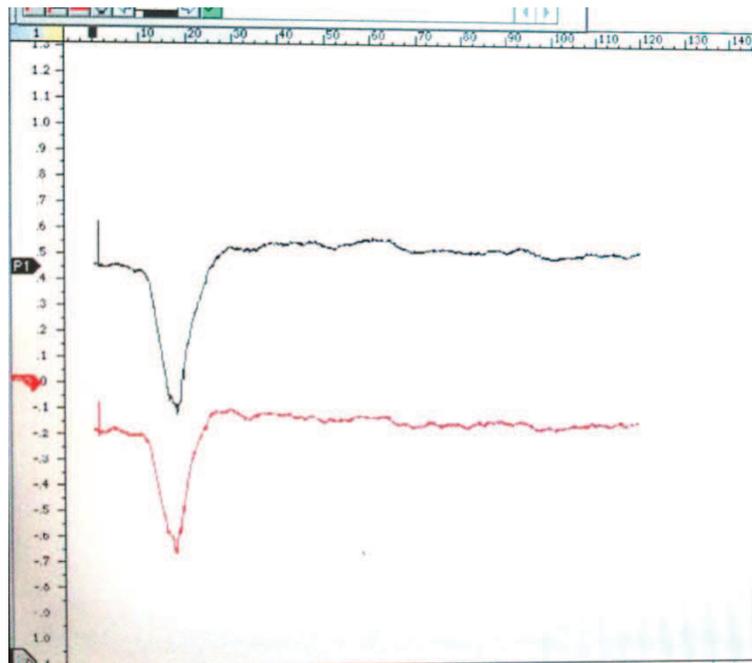


Figure 8 : Capture d'écran d'un potentiel de champ postsynaptique excitateur monosynaptique caractéristique dans le CPF après stimulation de l'hippocampe ventral (latence 18 ms).

Des stimulations tests ont été délivrées dans la région CA1/subiculum toutes les 30 secondes et ont permis de définir l'intensité de stimulation à utiliser dans la suite de l'expérience. Après l'enregistrement d'une activité basale de 30 minutes pendant laquelle des stimulations ont été appliquées toutes les 30 secondes dans l'hippocampe à l'intensité définie préalablement avec les stimulations tests, des stimulations à haute fréquence (SHF; HFS pour High Frequency Stimulation) et de même intensité ont été appliquées. Elles sont composées de 2 séries de 10 trains de stimulations (250 Hz, 200 ms) à 0,1 Hz qui sont séparées de 6 minutes. Ces SHF ont induit une augmentation de l'amplitude du potentiel de champ postsynaptique excitateur monosynaptique, phénomène correspondant à la PLT. La PLT a été enregistrée pendant 2 heures après les SHF. Le nombre d'animaux inclus dans les groupes a été de 10 (groupe CP) et de 9 (groupe VEH).

E) Neurohistologie par la coloration de Golgi

La coloration de Golgi est une technique de coloration qui nous a permis de **visualiser les neurones de la couche II/III du CPF médian (CPFm) afin d'étudier leur morphologie.**

Les rats (5 CP et 5 VEH) de la série 5 ont été anesthésiés avec du pentobarbital de sodium (60 mg/kg, i.p.) et ont reçu une perfusion intracardiaque de solution saline (0,9 %). Les cerveaux ont été prélevés et séparés en deux hémisphères qui ont été immergés à l'abri de la lumière pendant 5 jours ou 8 jours dans une solution de Golgi-Cox (10,4 g/l de dichromate de potassium, 10,4 g/l de mercuride chlorure et 8,33 g/l de chromate de potassium). Les hémisphères ont ensuite été immergés à l'abri de la lumière, dans une solution contenant 30 % de sucrose. Après une période de 10 jours, les hémisphères ont été placés dans une cuve remplie de solution de sucrose à 6 % et coupés (épaisseur de 200 µm) au vibratome (Leica VT 1000S). Les coupes ont été montées sur des lames gélatinées et séchées avec du papier filtre avant d'être placées dans une solution d'ammonium hydroxyde pendant 30 minutes. Elles ont ensuite été rincées à l'eau durant 1 minute et placées dans une solution de fixateur Kodak pendant 30 minutes avant d'être déshydratées dans des bains croissants d'éthanol : éthanol 70 % (2 minutes), éthanol 95 % (2 minutes), éthanol absolu (10 minutes). Enfin, les coupes ont été immergées pendant 15 minutes dans une solution de xylène, éthanol, chloroforme (1:1:1) puis purifiées dans du xylène pendant 15 minutes. Le montage des lamelles a été réalisé avec du Depex®.

Cette méthode permet de **colorer 5 à 10 % des neurones du tissu.** La révélation, dont le principe est le même que celui de la révélation photographique argentique, s'effectue par imprégnation des neurones par les métaux lourds (dichromate de potassium, mercuride chlorure et chromate de potassium). Les coupes successives d'épaisseur de 200 µm augmentent les chances d'obtenir des neurones entiers dans le plan de section. Les coupes ont ensuite été observées avec un microscope (Zeiss, Axio Imager M1) équipé d'une caméra (AxioCam MRm CCD camera ; Zeiss). Les images ont été acquises avec un objectif X 20 et le logiciel AxioVision 4.7 (Zeiss). Les neurones pyramidaux des couches II/III du CPFm (Figure 9) ont été sélectionnés selon différents critères :

- 1) présentation de tous les caractères des neurones pyramidaux définis par la présence d'un corps cellulaire triangulaire à partir duquel se développent un arbre dendritique basal et une seule dendrite apicale,
- 2) localisation du corps cellulaire à environ 250 à 350 µm de la surface piale,
- 3) positionnement au milieu d'une section et à l'écart des neurones voisins pour éviter les croisements dendritiques entre eux,
- 4) situation à l'écart des vaisseaux sanguins,
- 5) taille de corps cellulaire similaire entre les neurones.

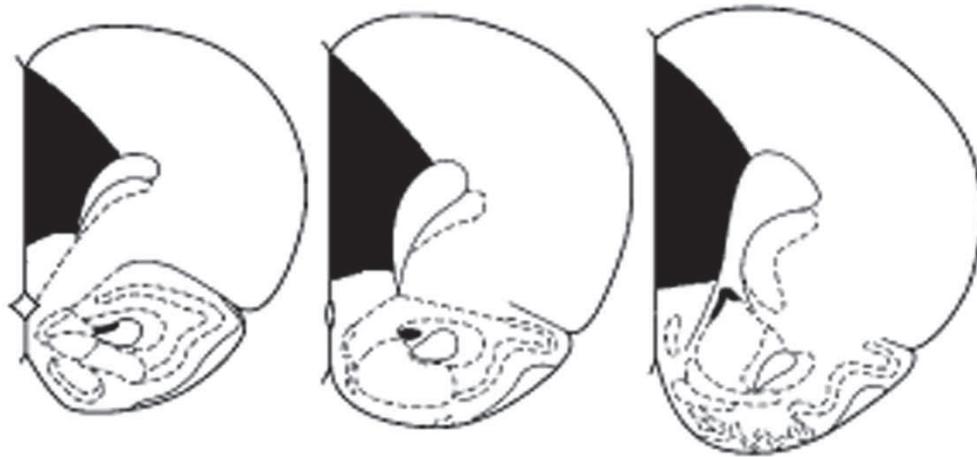


Figure 9 : Zone d'intérêt du CPFm sur les coupes effectuées entre Bregma 2,7 et 3,7mm (Zone noircie= cortex cingulaire, cortex limbique et cortex prélimbique).

Les neurones sélectionnés ont été photographiés (Figure 10) dans leurs couches successives de manière à pouvoir reconstituer manuellement, à l'aide de papier calque, l'arborisation du neurone (Figure 11). Il a été nécessaire de réaliser une dizaine de photographies de couches successives pour reconstruire un neurone dans sa totalité. Nous avons ainsi reconstruit 25 neurones de rats adultes traités avec le CP55, 940 et 24 neurones de rats adultes traités avec le VEH pendant l'adolescence.

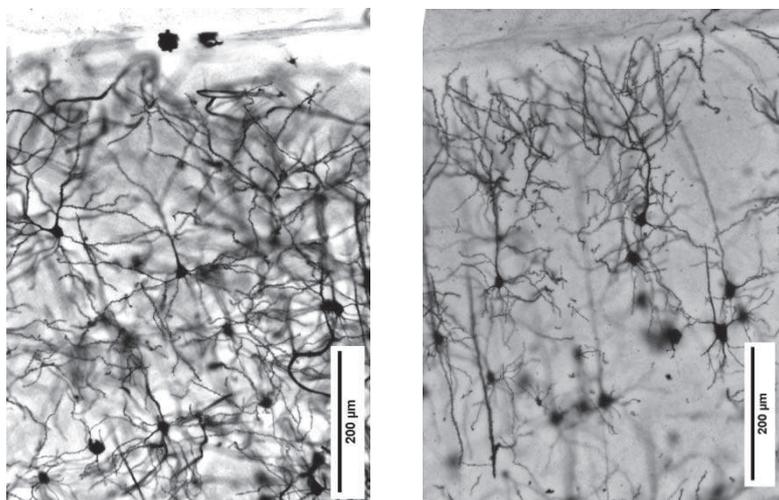


Figure 10 : Exemple de photographies de neurones pyramidaux de la couche II/III du CPF.

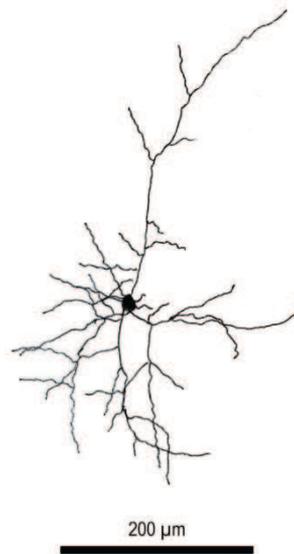
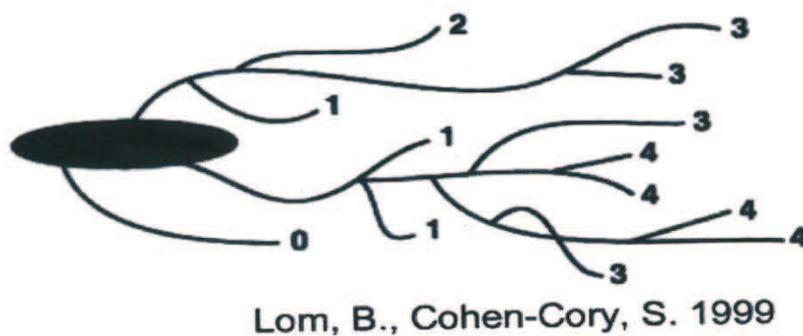


Figure 11 : Exemple de reconstruction manuelle d'un neurone.

Les neurones ont ensuite été redessinés manuellement à l'aide du logiciel Image J (plugin neurone J) ce qui a permis de quantifier la longueur des dendrites basales et apicales ainsi que la longueur totale de l'arborisation dendritique en fonction de l'échelle définie. Nous avons aussi évalué la complexité dendritique du neurone (DCI). Pour cela, il a fallu sommer les ordres des terminaisons dendritiques, y ajouter le nombre de terminaisons dendritiques, diviser par le nombre de dendrites primaires et multiplier le tout par la longueur totale de l'arborisation (Figure 12). Le DCI des dendrites apicales et basales a été calculé.



$$DCI = \frac{(\sum \text{ordres des terminaisons dendritiques} + \text{nombre de terminaisons dendritiques}) \times \text{lg totale}}{(\text{nombre de dendrites primaires})}$$

Figure 12 : Etude de complexité de l'arbre dendritique par calcul de DCI.

F) Etude biochimique: Evaluer le niveau d'expression de certains marqueurs de plasticité synaptique par Western blot.

1) Dissection des structures cérébrales

Des rats (6 CP et 6 VEH) de la série 5 ont été anesthésiés avec du pentobarbital de sodium (60 mg/kg, i.p.). Après décapitation, les cerveaux ont été prélevés et les structures cérébrales d'intérêt ont été disséquées à froid sur de la glace (CPF et hippocampe). Une fois disséquées, les structures ont été congelées puis conservées à -80°C jusqu'à la préparation des échantillons.

2) Préparation des échantillons

Les échantillons ont été homogénéisés avec un broyeur-homogénéiseur de Potter dans un tampon à 4°C (10 mM Hepes pH 7.5, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM sodium orthovanadate, 50 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 0.5 % Triton) en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Le tissu homogénéisé a été centrifugé à 13,000 rpm à 4 °C pendant 3 min. Le surnageant a été prélevé et utilisé comme lysat de protéines totales. Les concentrations en protéines ont été déterminées à l'aide d'un kit BCA (Bicinchoninic Acid) et d'un Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

3) Western Blot

Les échantillons contenant les protéines ont été suspendus dans du tampon de Laemmli (Biorad). Les protéines ont ensuite été séparées par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (10%, Criterion™ Precast Gel, 10 % Tris-HCl, Bio-Rad) puis transférées électriquement sur une membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène) de 0,2 µm d'épaisseur (Bio-Rad). Les membranes ont été incubées durant 30 minutes dans un tampon pour le blocage des sites non spécifiques (0,1 % Tris Buffered Saline (TBS)-Tween 20 ; 5 % BSA ; 0,02 % NaN₃) puis incubées toute la nuit (4°C) avec des anticorps dirigés contre les protéines d'intérêt: synaptophysine (1 : 1000 ; Abcam), PSD95 (1 : 2000 ; Abcam), VGLUT3 (1 : 500 ; Abcam). Les protéines de normalisation utilisées étaient l'actine (1 : 5000 ; Millipore) et la β-tubuline (1 : 10000 Sigma). Après 3 lavages dans du TBS 0,1 % - Tween 20, les membranes ont été incubées 1h avec des anticorps de lapin ou de souris, conjugués à de la peroxydase puis leur immunoréactivité a été visualisée par la méthode d'amplification de la chimioluminescence (Super Signal™ ThermoScientific). L'analyse densitométrique de la quantité de protéines a été réalisée grâce au logiciel de quantification Quantity One (Biorad). Les expressions des protéines ont été déterminées par un rapport de densité optique (DO) indexé sur l'actine ou la tubuline.

G) Analyses statistiques

Pour les tests comportementaux de reconnaissance et de localisation d'objets, la performance est évaluée selon le temps passé en exploration pour chaque objet (familier vs

nouveau) ou pour chaque localisation d'objets (familière vs nouvelle) durant la phase T2. A chaque âge (adolescent ou adulte), une analyse de variance multifactorielle ANOVA (avec les facteurs souche, délai, traitement et objet/localisation) avec mesures répétées sur le facteur objet/localisation a été effectuée. Lorsqu'une interaction entre facteurs était significative, un test post-hoc HSD de Tukey a été réalisé.

Les données issues des études électrophysiologiques sont moyennées en périodes consécutives de 30 minutes (t_0 –30 min; t_{30} –60 min; t_{60} –90 min; t_{90} –120min) après l'induction de la PLT et comparées entre elles grâce à une analyse de variance ANOVA à 1 facteur (traitement).

Les données issues de l'analyse morphologique des neurones par la technique de Golgi-Cox et concernant le nombre et la longueur des dendrites totales, apicales et basales ainsi que le DCI, ont été moyennées et comparées entre elles à l'aide d'une analyse de variance ANOVA à 1 facteur (traitement).

Les données biochimiques (Western Blot) ont été comparées entre les groupes (CP vs VEH) et analysées en utilisant le test t de Student bilatéral pour échantillons non appariés.

Troisième partie

Articles et résultats expérimentaux

Article 1 : Long-term cognitive impairments induced by chronic cannabinoid exposure during adolescence in rats : a strain comparison.

Justine Renard, Marie-Odile Krebs, Thérèse M Jay, Gwenaëlle Le Pen
Psychopharmacology, 2012 Sep 16

Contexte

Le cannabis est l'une des substances psychoactives les plus consommées dans le monde. Sa consommation est préoccupante pendant l'adolescence qui représente une grande période de maturation structurelle et fonctionnelle du système nerveux. Plusieurs études épidémiologiques montrent que les adolescents qui consomment du cannabis avant l'âge de 17 ans développent des troubles cognitifs persistants et durables à l'âge adulte, pouvant s'apparenter à ceux observés dans les pathologies psychiatriques, notamment la schizophrénie. Les risques associés à la consommation de cannabis se situent donc à l'adolescence ce qui suggère que le cannabis agit sur la maturation du système nerveux durant cette période de vulnérabilité pour induire des anomalies comportementales.

Objectifs

Nous avons évalué les effets cognitifs à long terme suite à une exposition chronique aux cannabinoïdes (CP55, 940) durant l'adolescence (JPN 29-50) ou durant l'âge adulte (JPN 70-91) chez deux souches de rats: les rats Wistar et les rats Lister Hooded. Ces deux souches de rats sont connues pour présenter des valeurs hédoniques différentes pour les cannabinoïdes. En effet, les rats Lister Hooded présentent une plus grande sensibilité que les rats Wistar aux propriétés appétitives des cannabinoïdes. Ceci pourrait entraîner des conséquences comportementales plus importantes à long terme après une exposition pendant l'adolescence. Les performances cognitives des animaux ont été évaluées 28 jours après l'arrêt du traitement dans une tâche de reconnaissance d'objets et une tâche de localisation d'objets. La différence entre ces deux tests est l'intégration d'une information spatiale dans le test de la localisation d'objets par rapport à celui de la reconnaissance d'objets. Ces tests sont utilisés pour étudier la mémoire à court-terme et la mémoire de travail spatiale.

Résultats principaux

Nous avons montré que le traitement aux cannabinoïdes avec l'agoniste complet CP55, 940 (CP) durant l'adolescence chez le rat (JPN 29 à 50) entraîne des déficits cognitifs significatifs et durables chez les rats testés à l'âge adulte. Ces déficits se retrouvent (1) dans la mémoire à court terme chez les rats de souche Wistar et Lister Hooded testés après des intervalles de rétention de 30 minutes et de 120 minutes dans le test de la reconnaissance d'objets (2) dans la mémoire de travail spatiale chez les rats Wistar, testés après un intervalle de rétention de 30 minutes dans le test de la localisation d'objets. Ces déficits sont également mis en évidence chez les rats de la souche Lister Hooded, mais après un intervalle de rétention de 120 minutes. Néanmoins le même traitement aux cannabinoïdes délivré à l'âge adulte (JPN 70 à 91) n'entraîne aucun effet néfaste sur les deux types de mémoire préalablement testées chez les deux souches de rats. Les résultats renforcent l'idée que l'adolescence est une période de vulnérabilité pour les effets délétères des cannabinoïdes.

Les résultats montrent, pour la première fois, que le traitement aux cannabinoïdes durant l'adolescence entraîne des déficits durables de la mémoire de travail spatiale chez deux souches de rats différentes, mais de façon « délai dépendant ». Ces déficits cognitifs ne résultent pas d'un manque d'exploration ou de problèmes locomoteurs étant donné que l'activité locomotrice des rats n'est pas altérée. En effet, les rats traités passent autant de temps que les rats du groupe VEH à explorer les objets lors de la phase d'apprentissage T1. Nous démontrons également dans cette étude, que les rats de la souche Lister Hooded, connus pour présenter de fortes valences hédoniques pour les effets des cannabinoïdes, ne présentent pas plus de déficits cognitifs que les rats Wistar dans ces tâches et paraissent même moins sensibles que les rats de la souche Wistar, quant à ces effets néfastes sur la mémoire de spatiale évaluée à long terme.

Par ailleurs, cette étude met en évidence d'autres différences de performance de mémoire entre ces deux souches de rats. A l'inverse des rats de la souche Lister Hooded, les rats de la souche Wistar (traités au VEH ou au CP et quelque soit la période de traitement c'est-à-dire à l'adolescence ou à l'âge adulte), ne sont pas capables de discriminer la nouvelle localisation d'objet de la localisation familière lorsque le délai de rétention est de 120 minutes, suggérant une meilleure performance des rats Lister Hooded pour la mémoire spatiale. Cette différence de performance est aussi observée dans le test du labyrinthe radial à 8 bras où les rats de la souche Lister Hooded font moins d'erreur de mémoire spatiale de travail par rapport aux rats de la souche Wistar (Manahan-Vaughan and Schwegler 2011).

Ces déficits durables de performance de mémoire induits par l'exposition au CP durant l'adolescence résultent probablement d'une anomalie dans le développement ou dans la maturation des régions du SNC et/ou des circuits neuronaux impliqués dans les tâches de reconnaissance d'objets et de localisation d'objets. La tâche de la reconnaissance d'objets implique la participation d'un large réseau de connexions corticales et sous-corticales qui comprennent le cortex perirhinal, le CPF et le Nacc (Aggleton et al. 1997; Akirav and Maroun 2006; Ennaceur and Aggleton 1997; Horne et al. 2010; Warburton et al. 2000). Au delà des régions impliquées dans la reconnaissance d'objets, la capacité à localiser un objet (tâche de la localisation d'objets), qui inclut une composante spatiale, la contribution de l'hippocampe, sa connexion avec le CPF via le fornix s'y rajoutent (Aggleton et al. 2004; Bussey et al. 2000b; DeCoteau and Kesner 1998; Ennaceur and Aggleton 1997; Goodrich-Hunsaker et al. 2008;

Warburton and Brown 2009). Rappelons que les RCB1 sont fortement exprimés dans l'hippocampe, le CPF, le Nacc et l'amygdale (Glass et al. 1997; Herkenham et al. 1990; Tsou et al. 1998) et que des variations d'expressions des RCB1 sont observées dans ces régions durant l'adolescence (Ellgren et al. 2008) suggérant un rôle important dans la maturation du SNC. Ainsi, des modifications du fonctionnement des RCB1 et/ou de leur expression suite à une sur-activation durant l'adolescence pourraient contribuer au développement des troubles cognitifs observés après un traitement aux cannabinoïdes pendant cette période de vulnérabilité.

Long-term cognitive impairments induced by chronic cannabinoid exposure during adolescence in rats: a strain comparison

Justine Renard · Marie-Odile Krebs · Thérèse M. Jay · Gwenaëlle Le Pen

Received: 7 February 2012 / Accepted: 28 August 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract

Rationale During cerebral development, adolescence is a critical phase in which the endocannabinoid system plays an important role in regulating various neurotransmitters. Moreover, evidence from both human and animal studies suggests that chronic cannabinoid exposure during this vulnerable period can induce persistent brain and behavioural alterations.

Objectives The aim of this study was to compare the long-term cognitive consequences of chronic adolescence cannabinoid exposure between Lister Hooded rats and Wistar rats.

Methods Rats of both strains were injected daily throughout their adolescent or adult periods with vehicle or with incremental doses of the synthetic cannabinoid CB1 receptor agonist CP55,940 (CP). Short-term and spatial working memories were assessed using the object recognition and object location, tasks respectively. For both tasks, the effect of a 30- or 120-min delay between the learning and the testing phase was investigated.

Results In the object recognition task, adolescent CP exposure impaired short-term memory after both delays in both strains. In contrast, in the object location task, adolescent CP

exposure impaired spatial working memory in the Wistar rats after a 30-min delay, whereas the Lister Hooded rats exhibited a similar effect only after a 120-min delay. In these tests, no long-term deleterious effects were found following adult CP exposure in either strain.

Conclusions Our results confirm that adolescence is a critical period for the deleterious effects of cannabinoids on cognition and that these deleterious effects on spatial working memory are more strain-dependent than the effects observed on short-term memory.

Keywords Cannabinoid · Adolescence period · Object recognition task · Object location task

Introduction

Cannabis is among the most widely abused illicit drugs in humans following nicotine and alcohol (Ashton 2001; Yamaguchi and Kandel 1984). Although the use of cannabis has been long considered to be harmless, recent studies showed possible adverse health effects that appear to be more pronounced in young users, particularly users who begin using cannabis during adolescence (Ashtari et al. 2011; Solowij and Battisti 2008). Cannabis-dependent adolescents typically have the following well-characterised cognitive deficits: short-term memory and verbal fluency impairments, attentional dysfunction, and poor performance in executive functioning (Pope et al. 2001; Schwartz et al. 1989; Solowij and Battisti 2008). The adolescent period represents a critical phase of development that is characterised by strong neurobehavioural plasticity and specific neurobiological features such as maturational processes that are characterised by progressive and specific changes, including myelination and synaptic pruning that occur primarily in the prefrontal cortex and limbic regions (Casey et al. 2000;

Thérèse M. Jay and Gwenaëlle Le Pen contributed equally to this work.

J. Renard · M.-O. Krebs · T. M. Jay · G. Le Pen
Laboratoire de “Physiopathologie des maladies Psychiatriques”,
Centre de Psychiatrie et Neurosciences U894, INSERM,
Paris, France

J. Renard · M.-O. Krebs · T. M. Jay · G. Le Pen
Faculté de Médecine Paris Descartes, Université Paris Descartes,
Paris, France

G. Le Pen (✉)
Centre de Psychiatrie et de Neurosciences, INSERM U894,
2ter rue d’Alésia,
75014 Paris, France
e-mail: gwenaelle.le-pen@inserm.fr

Chechik et al. 1999; Paus et al. 1999; Tarazi et al. 1998; 1999). This period of maturation also involves the rearrangement of neurotransmitter system such as the glutamate, GABA, dopamine and endocannabinoid systems, and these changes are believed to support the emergence of adult cognitive processes (Andersen 2003; Spear 2000). Cannabinoid receptors and endogenous cannabinoid ligands are present and are active early in brain development, and their density varies throughout the developmental stages, particularly during puberty (Rodriguez de Fonseca et al. 1993). The psychoactive effects of cannabis are mediated primarily by the cannabinoid CB1 receptor (RCB1), which is present at high densities in the prefrontal cortex and other limbic regions that are implicated in learning and memory processes (Herkenham et al. 1990).

Animal models are useful tools for investigating the potential long-term behavioural and cognitive effects of exposure to cannabis during adolescence. Indeed, cannabinoid exposure in the rat during or around adolescence can have deleterious cognitive effects (Harte and Dow-Edwards 2010; Higuera-Matas et al. 2009; O'Shea et al. 2006; O'Shea et al. 2004; Quinn et al. 2008; Rubino et al. 2009; Schneider and Koch 2003; 2005). To the best of our knowledge, no animal study has investigated whether increased sensitivity to cannabis can predict higher long-term deleterious effects following adolescent cannabinoid exposure. In the present study, we tested this hypothesis by comparing the long-term cognitive effects of chronic adolescent or adult cannabinoid exposure in two strains of rats, Wistar and Lister Hooded rats, which have been reported to exhibit differences in hedonic valence for cannabinoid CB1 agonists. Indeed, Lister Hooded rats, in contrast to albino rats, can achieve stable cannabinoid intravenous self-administration (Deiana et al. 2007). Furthermore, cannabinoid agonists have been shown to induce place aversion in Wistar rats (Chaperon et al. 1998; McGregor et al. 1996; Pandolfo et al. 2009) and cause significant avoidance to a flavoured fluid (saccharin) with which it was paired (McGregor et al. 1996). Thus, the working and spatial memory performances of rats exposed during either adolescence or adulthood to the synthetic cannabinoid full agonist CP55,940 (CP) were evaluated using the spontaneous object recognition and location tests.

Material and methods

Animals

A total of 48 male Wistar Han and 48 male Lister Hooded rats (Harlan, Netherland) were used for these experiments. The rats for the adolescent and adult CP exposure experiments were obtained at postnatal day (PND) 22 and 63, respectively. The animals were group-housed in Macrolon cages at four rats per cage with respect to their treatment

status under standard conditions on a 12 h light–dark schedule (with the lights on from 700–1900 hours). The animals received free access to water and were fed ad libitum. All procedures were performed in accordance with National (JO 887-848) and European (86/609/EEC) legislation regarding animal experimentation.

Drug preparation and administration

Rats treated with CP55,940 (–)*cis*-3-[2-hydroxy-4-(1,1-dimethylheptyl)phenyl]-*trans*-4-(3-hydroxypropyl)cyclohexanol (CP; Tocris Cookson, UK) received increasing doses of CP (0.15, 0.20 and 0.30 mg/kg for 7 days at each dose), whereas the control groups received similar exposure to the drug's vehicle. Gradually increasing doses of CP were administered to partially counter the development of drug tolerance (Gonzalez et al. 2005). These specific CP doses were chosen based on previous experiments from our own laboratory and other groups (O'Shea et al. 2006) in which the use of similar doses produced long-term behavioural impairments. CP was dissolved in DMSO (to 10 % of the final volume), suspended in Tween 80 (to 20 % of the final volume) and diluted in physiological saline (0.9 % NaCl). All injections were administered intraperitoneally at a volume of 1 ml/kg.

In both strains, the adolescent and adult CP exposure experiments began at PND 29 and 70, respectively. During the 3-week treatment period, the animals received CP or vehicle (VEH) as described above. Behavioural tests were initiated following a 28-day drug-free period (at PND 77 for the adolescent groups and PND 118 for the adult groups). A diagram depicting the schedule of the drug treatments and experimental procedures is shown in Fig. 1.

Handling and habituation

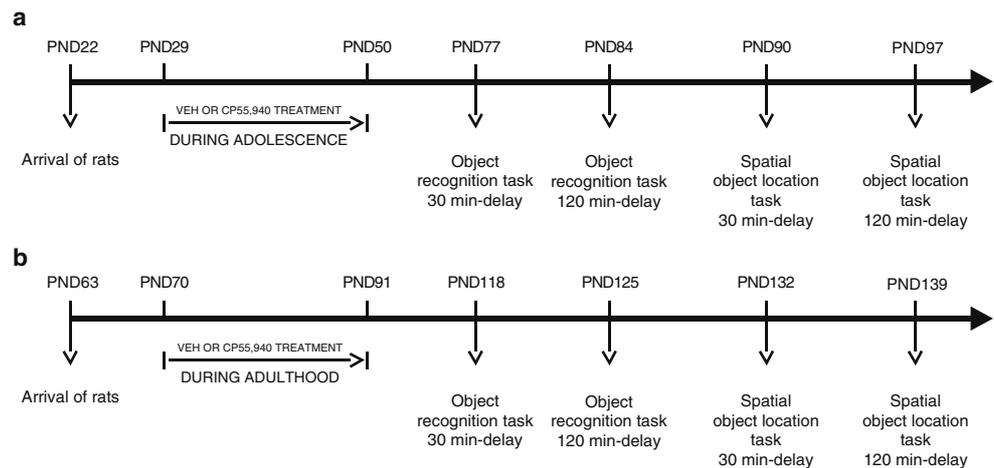
The rats were handled daily for 1 week prior to the study and were then habituated to the apparatus and test room.

The day before the test, each animal was submitted to a habituation session in the open field and allowed to freely explore the arena for two non-consecutive 3-min periods. On the test day, the animals were placed in the experimental room at least 30 min prior to testing.

Apparatus and procedure

The apparatus consisted of a plastic open field (80 cm × 80 cm × 50 cm). The experiments were performed under dimly lit conditions (50 lx). The objects to be discriminated (eight different matter and colour bottles, 20 cm height) were available three times as follows: two were used in the first trial, and the third was used in the second trial. The objects were affixed (using adhesive paste) to the floor of the box to ensure that they could not be displaced by the

Fig. 1 Time schedule of cannabinoid exposure and behavioural testing following exposure to cannabinoids during either **a** adolescence or **b** adulthood



rats. Each rat was tested using both tasks at both delays (i.e. 30 and 120 min) (Fig. 1).

The object recognition task

The animals were tested using the object recognition task as described previously (Ennaceur and Delacour 1988). This task evaluates the ability of the animal to discriminate between the familiarities of previously encountered objects; normal rats typically spend more time exploring a novel object than a familiar object.

The test sessions consisted of two 3-min trials. During the first trial (T1=acquisition trial), each rat was placed in the centre of an arena containing two identical objects placed in the far corners 15 cm from the side wall. After a delay of either 30 or 120 min during which the animal was returned to its cage, and both objects were replaced (one by an identical copy, the other by a novel object in the same location), the rat was returned to the arena for the second trial (T2=test trial). From rat to rat, both the role (familiar or novel object) and the relative position of the two objects were counterbalanced and randomly permuted. Between each trial, the objects were cleaned with water to avoid odour trails.

Some rats were excluded from the experiment because they exhibited a lack of exploratory behaviour (defined as an exploration time <3 s for the two objects during both the training and testing trials). The final number of animals in each group was as follows: in adolescent pre-treated rats with a 30-min delay, VEH-treated group ($n=10$ Lister Hooded rats and $n=12$ Wistar rats) and CP-treated group ($n=11$ Lister Hooded rats and $n=11$ Wistar rats); in the 120-min delay, VEH-treated group ($n=11$ Lister Hooded rats and $n=12$ Wistar rats) and CP-treated group ($n=12$ Lister Hooded rats and $n=11$ Wistar rats). In the adult pre-treated rats with a 30-min delay, VEH-treated group ($n=11$ Lister Hooded rats and $n=12$ Wistar rats) and CP-treated group

($n=12$ Lister Hooded rats and $n=10$ Wistar rats); for the 120 min delay, VEH-treated group ($n=12$ Lister Hooded rats and $n=12$ Wistar rats) and CP-treated group ($n=12$ Lister Hooded rats and $n=11$ Wistar rats).

The object location task

This task evaluates an animal's ability to correctly identify that an object has been moved to a novel location. The training trial of the object location task was identical to that of the recognition task. The session consisted of two 3-min trials. During the first trial (T1=acquisition trial), each rat was placed in the centre of an arena containing two identical objects placed in the far corners 15 cm from the side wall. After a delay of either 30 or 120 min during which the animal was returned to its cage, and both objects were replaced by their identical copies, with one object placed in a previously experienced location in the box (familiar location) and the other object placed in the diagonal corner (novel location), the rat was returned to the arena for the second trial. From rat to rat, both the role (familiar or novel location) and the relative position of the two objects were counterbalanced and randomly permuted. Between each trial, the objects were cleaned with water to avoid odour trails.

Some rats were excluded from the experiment because they exhibited a lack of exploratory behaviour (defined as an exploration time <3 s for the two objects during both the training and testing trials). The final number of animals in each group was as follows: in the adolescent pre-treated group with a 30-min delay, VEH-treated group ($n=12$ Lister Hooded rats and $n=12$ Wistar rats) and CP-treated group ($n=12$ Lister Hooded rats and $n=11$ Wistar rats); for the 120-min delay, VEH-treated group ($n=12$ Lister Hooded rats and $n=12$ Wistar rats) and CP-treated group ($n=12$ Lister Hooded rats and $n=11$ Wistar rats). In the adult pre-treated group with a 30-min delay, VEH-treated group

($n=12$ Lister Hooded rats and $n=11$ Wistar rats) and CP-treated group ($n=12$ Lister Hooded rats and $n=11$ Wistar rats); for the 120-min delay, VEH-treated group ($n=11$ Lister Hooded rats and $n=12$ Wistar rats) and CP-treated group ($n=12$ Lister Hooded rats and $n=12$ Wistar rats).

Data scoring and analysis

A video camera was positioned 150 cm above an open field. The experimenter, located in a room adjacent to the room containing the open field, manually recorded the time spent exploring each object in both the training (T1) and testing (T2) periods. Exploration was defined as an animal positioning its nose within 2 cm of the object while looking at the object, sniffing it or touching it with its nose. Turning around, climbing, sitting or playing with an object was not considered to be exploratory behaviour.

Object recognition memory and spatial object location memory were calculated as the time spent investigating each object during the T2 phase. A four-way (strain \times delay \times treatment \times object or location) analysis of variance (ANOVA) with repeated measures on the object or location factor (familiar vs. novel) was used to analyse the data for both age groups. Because different numbers of animals were excluded from the experiments with the 30- and 120-min delays, the factor delay could not be considered as a repeated measure. Where appropriate, the data from each strain were considered independently, and a post-hoc Tukey's test was used for multiple comparisons. Differences with a p value less than 0.05 were considered to be significant.

Results

Object recognition

In the adolescent pre-treated group, the ANOVA analysis revealed that the Wistar rats spent significantly less time exploring the two objects during the test session compared to the Lister Hooded rats [$F(1,82)=15.6, p<0.001$] (Fig. 2). This analysis also revealed an overall decrease in the time spent exploring the two objects when the delay was increased from 30 to 120 min between T1 and T2 [$F(1, 82)=5.9, p<0.001$]. There were also significant (object \times CP) and (object \times delay) interactions [$F(1, 82)=16.3$ and $8.1, p<0.001$ and $p<0.01$, respectively], suggesting that both the CP treatment and the delay influence the time spent exploring the familiar/novel object. Thus, separate ANOVAs were performed for each delay tested. For both the 30- and 120-min delays, the Wistar rats spent significantly less time than the Lister Hooded rats exploring the two objects during the test session (Fig. 2) [$F(1,40)=6.4, p<0.05$ and $F(1,42)=9.5, p<0.01$, respectively]. These

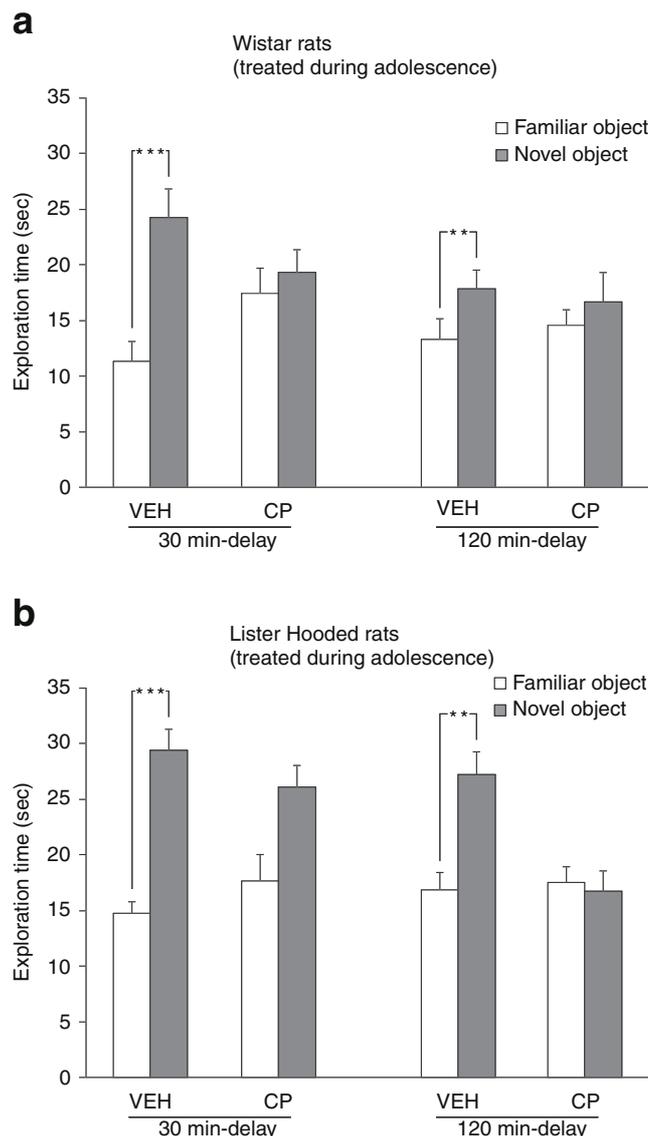


Fig. 2 Object recognition performance of **a** Wistar and **b** Lister Hooded rats treated chronically with the cannabinoid agonist CP 55,940 (CP) or vehicle (VEH) during adolescence. The exploration time (novel object vs. familiar object) during testing phase T2 after a delay interval of either 30 or 120 min in **a** Wistar and **b** Lister Hooded rats. A clear significant preference for novel over familiar objects was observed for both delays in the VEH-treated **a** Wistar and **b** Lister Hooded rats. The time spent exploring the novel and familiar objects was similar in the CP-treated **a** Wistar and **b** Lister Hooded rats. In this and subsequent figures, the bars represent mean \pm SEM. Significant differences in exploration times between the novel and familiar objects are indicated with asterisks (***) $p<0.001$; ** $p<0.01$). ANOVA followed by a post-hoc Tukey's test

analyses also revealed a significant (object \times CP) interaction [$F(1, 40)=9.1, p<0.01$ and $F(1,42)=7.2, p<0.05$, for the 30- and the 120-min delay, respectively], suggesting that CP treatment interferes with the preference for the novel object. Indeed, in both strains and with both the 30- and 120-min delays, a clear preference for the novel object was observed in comparison with the familiar one in the VEH-treated rats

($p < 0.001$ and $p < 0.01$ for the 30- and the 120-min delay, respectively), whereas the times spent exploring familiar and novel objects were similar in the CP-treated rats (Fig. 2).

In the adult pre-treated group, the ANOVA analysis revealed an overall decrease in the time spent exploring the two objects when the delay between T1 and T2 was increased from 30 to 120 min [$F(1, 84) = 7.25$, $p < 0.01$] (Fig. 3). The analysis also revealed a main effect of the familiar/novel object factor [$F(1, 84) = 151.29$, $p < 0.001$], indicating that the rats explored the novel object for a longer time period than they explored the familiar object. However, there was no significant effect of either rat strain or CP

treatment [$F(1, 84) = 0.15$ and 0.3 respectively], suggesting that rats of either strain that were exposed to CP in adulthood explored the novel object for a longer time period than they explored the familiar object, irrespective of the delay between T1 and T2 (Fig. 3).

Spatial object location

In the adolescent pre-treated group, there was an overall decrease in the time spent exploring the objects when the delay between T1 and T2 was increased from 30 to 120 min [$F(1, 86) = 5$, $p < 0.05$] (Fig. 4). In addition, significant (strain \times CP), (object location \times delay), (object location \times strain) and (object location \times CP) interactions were observed [$F(1, 86) = 20.2, 10, 18.3$ and 11.2 , respectively], suggesting an effect of strain on performance in the object location task. Thus, separate ANOVAs were performed for the two strains of rats. In the Wistar rats, there was a significant effect of CP treatment on the time spent exploring the two object locations [$F(1, 42) = 9.1$, $p < 0.01$]. This analysis revealed significant (object location \times delay) and (object location \times CP) interactions [$F(1, 42) = 5.9$ and 10.4 , $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively], suggesting that the preference exhibited by Wistar rats for objects at the novel location during the test session was modified by both the delay and the CP treatment (Fig. 4a). Thus, for the 30-min delay, the ANOVA revealed a significant (object location \times CP) interaction [$F(1, 21) = 6.1$, $p < 0.05$], suggesting that in Wistar rats, CP treatment affected the time spent exploring the two object locations. Post-hoc comparisons revealed that for the 30-min delay, the VEH-treated rats spent more time exploring the object that was placed in the novel location ($p < 0.05$), whereas the CP-treated rats did not (Fig. 4a). Finally, for the 120-min delay, CP treatment decreased time spent exploring the two objects [$F(1, 21) = 4.4$, $p < 0.05$] (Fig. 4a). There was also a significant (object location \times CP) interaction [$F(1, 21) = 4.6$, $p < 0.05$], indicating that in Wistar rats, CP treatment affected the time spent exploring the two object locations. Nevertheless, post-hoc comparisons revealed that for the 120-min delay, both the VEH-treated and CP-treated rats spent approximately the same length of time exploring the two object locations (Fig. 4a). These comparisons revealed that CP treatment increased only the time spent exploring the familiar object location. In the Lister Hooded rats, the ANOVA revealed a significant effect of CP treatment on the time spent exploring the two object locations [$F(1, 44) = 11.3$, $p < 0.01$] (Fig. 4b). In addition, the analysis also revealed significant (object location \times delay) and (object location \times delay \times CP interactions) [$F(1, 44) = 4.1$ and 4 , respectively, both $p < 0.05$], suggesting that in Lister Hooded rats, the preference for objects at the novel location during the test session was modified by both the delay and the CP treatment. A post-hoc analysis revealed

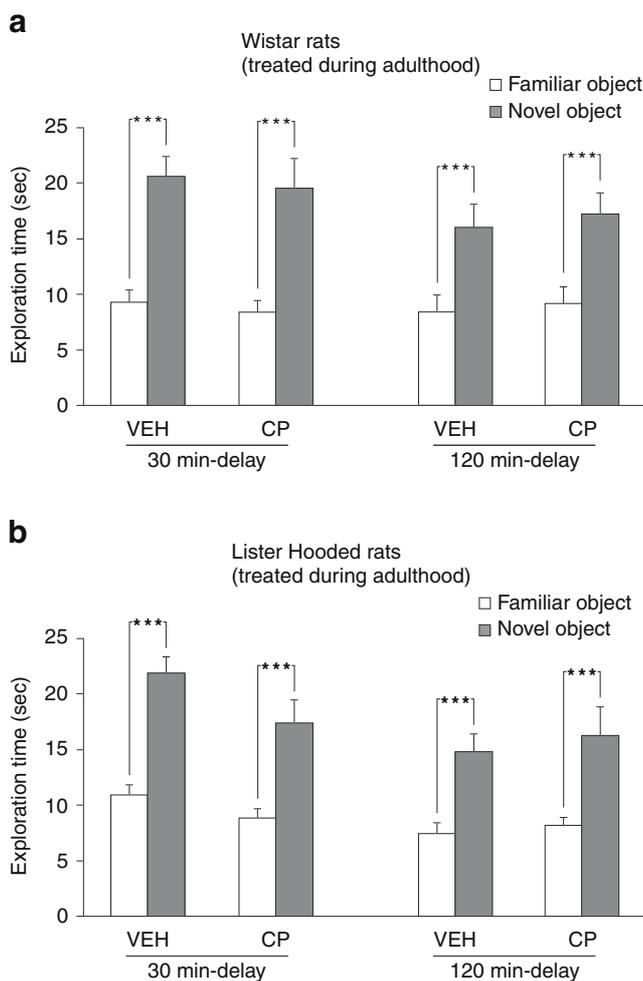


Fig. 3 Object recognition performance in **a** Wistar and **b** Lister Hooded rats treated chronically with the cannabinoid agonist CP 55,940 or vehicle during adulthood. The exploration time (novel object vs. familiar object) during testing phase T2 after a delay interval of either 30 or 120 min in **a** Wistar and **b** Lister Hooded rats. A clear significant preference for novel over familiar objects was observed at both delays in both the VEH-treated and CP-treated **a** Wistar and **b** Lister Hooded rats. Significant differences between the exploration times of the novel and familiar objects are indicated with asterisks ($***p < 0.001$). ANOVA followed by a post-hoc Tukey's test

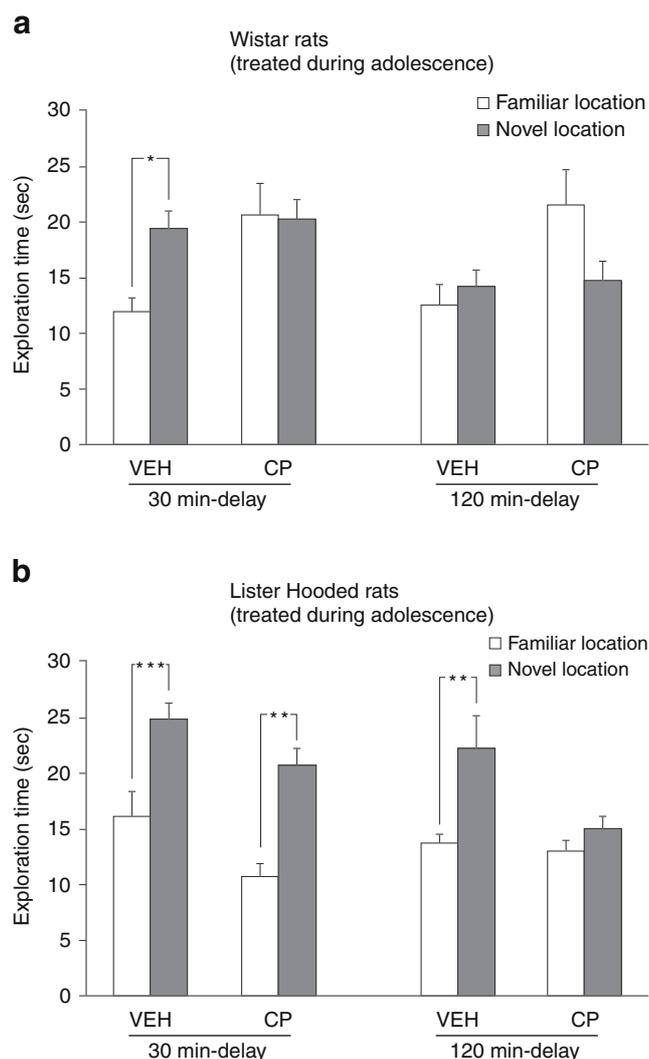


Fig. 4 Object location performance in **a** Wistar and **b** Lister Hooded rats treated chronically with the cannabinoid agonist CP 55,940 or vehicle during adolescence. The exploration time (novel location vs. familiar location) during testing phase T2 after a delay interval of either 30 or 120 min in **a** Wistar and **b** Lister Hooded rats. In panel **a**, for the 30-min delay, a clear significant preference for the novel over the familiar location was observed in the VEH-treated Wistar rats but not in the CP-treated Wistar rats. For the 120-min delay, the VEH-treated and CP-treated Wistar rats spent similar lengths of time exploring the object in the novel and familiar locations. In panel **b**, for the 30-min delay, a clear significant preference for the object in the novel over the familiar location was observed in the VEH-treated and CP-treated Lister Hooded rats; in contrast, for the 120-min delay, only the VEH-treated Lister Hooded rats exhibited a clear preference for the object in the novel location over the familiar location. Significant differences between the exploration times of the objects in the novel and familiar locations are indicated with asterisks (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$). ANOVA followed by a post-hoc Tukey's test

that for the 30-min delay, both the VEH-treated and CP-treated rats spent significantly more time exploring objects at the novel location than objects at the familiar location ($p < 0.001$ and $p < 0.01$ for the VEH-treated and CP-treated rats, respectively) (Fig. 4b); in contrast, in the 120-min

delay group, only the VEH-treated rats spent significantly more time exploring objects at the novel location than objects at the familiar location ($p < 0.01$) (Fig. 4b).

In the adult pre-treated group, the Wistar rats spent significantly less time exploring the two objects during the test session than the Lister Hooded rats [$F(1,85)=6.29$; $p < 0.05$] (Fig. 5). An overall decrease in the amount of time spent exploring the objects was observed when the delay between T1 and T2 was increased from 30 to 120 min [$F(1, 85) = 4.914$, $p < 0.05$] (Fig. 5). However, CP treatment did not have a significant effect [$F(1, 85)=0.56$]. All of the rats combined spent more time exploring the objects at the novel location than at the familiar location [$F(1, 85)=117.7$, $p < 0.001$]. Moreover, significant (strain \times object location) and (delay \times object location) interactions were observed [$F(1, 85)=8.17$ and 6.74 , respectively], suggesting different effects of strain and delay on performance in the object location task. Thus, separate ANOVAs were performed for both strains of rats. In the Wistar rats, there was a significant (object \times delay) interaction, suggesting a preference by the Wistar rats for objects at the novel location that was modified by the delay. Post-hoc comparisons revealed that for the 30-min delay, both the VEH-treated and CP-treated rats exhibited a clear preference for the novel object location ($p < 0.001$); in contrast, for the 120-min delay, these two groups of rats spent approximately the same length of time exploring the two object locations (Fig. 5a). In the Lister Hooded rats, there was a significant main effect of the familiar/novel object location factor [$F(1, 43)=86.2$, $p < 0.001$], indicating that the rats globally spent more time exploring objects at the novel location than the objects at the familiar location (Fig. 5b), irrespective of either the delay or the treatment as revealed by the absence of significant interactions between these two factors.

Discussion

The present study shows that, in contrast to chronic CP exposure in adulthood, chronic CP exposure during adolescence using the full cannabinoid agonist CP55,940 leads to long-term deleterious effects on cognitive processes involving both non-spatial and spatial information processing in both Wistar and Lister Hooded rats. In addition, our results show that Lister Hooded rats are less sensitive than Wistar rats to the long-term deleterious effect of cannabinoid agonists on spatial working memory.

Using the object recognition task, we found that adolescent but not adult treatment with CP 55,940 abolished the preference for the novel object over the familiar object at both the 30- and 120-min delay intervals in the Wistar and Lister Hooded rats when adult. These data demonstrate that cannabinoid exposure during adolescence impairs short-

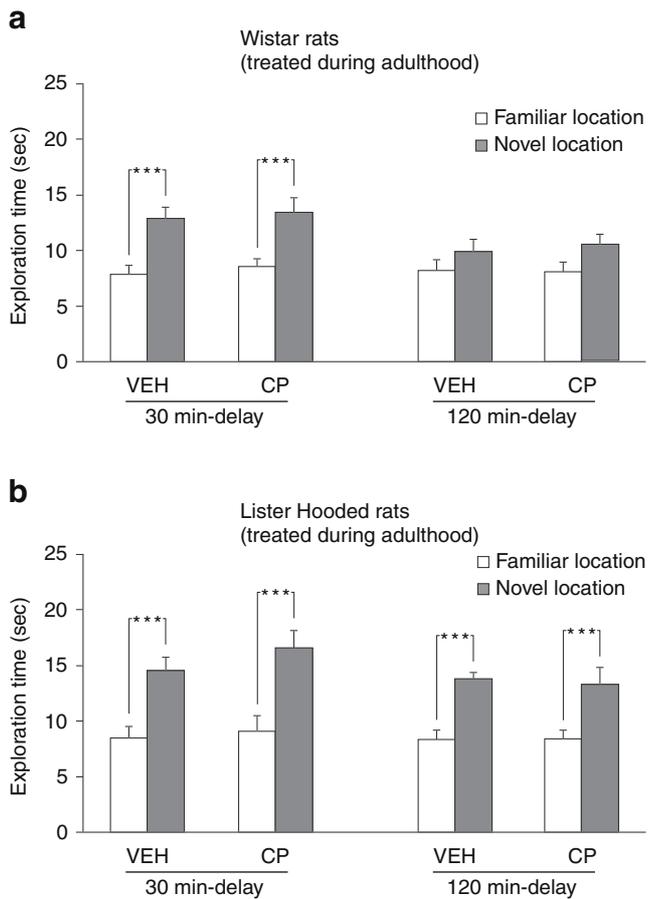


Fig. 5 Object location performance in **a** Wistar and **b** Lister Hooded rats treated chronically with the cannabinoid agonist CP 55,940 or vehicle during adulthood. The exploration time (object in a novel location vs. object in a familiar location) during testing phase T2 after a delay interval of either 30 or 120 min in **a** Wistar and **b** Lister Hooded rats. A clear significant preference for the object in the novel location over the familiar location was observed for the 30-min delay in the VEH-treated and CP-treated Wistar rats (panel **a**). The time spent exploring the object in the novel location relative to the familiar location was similar for the 120-min delay groups in the VEH-treated and CP-treated Wistar rats (panel **a**). A clear significant preference for the object in the novel location over the familiar location was observed for both delays (30 and 120 min) in the VEH-treated and CP-treated Lister Hooded rats (panel **b**). Significant differences between the exploration times of the objects in the novel and familiar locations are indicated with *asterisks* ($***p < 0.001$). ANOVA followed by a post-hoc Tukey's test

term memory at adulthood similarly in both strains of rats. Using the object location test, we found that adolescent treatment with CP 55,940 abolished the preference for the object in the novel location over the familiar location in the 30-min delay in the group of Wistar rats. The delay needed to be increased to 120 min in order to observe a similar deficit in the Lister Hooded rats. Our findings demonstrate for the first time delay-dependent impaired spatial working memory in two different strains of rat. We found that locomotor activity measured during the object recognition and

object location tasks was not affected by adolescent CP 55,940 exposure (data not shown), suggesting that the impairments in both tasks were not the result of locomotor activity abnormalities or a lack of exploration. These results also demonstrate that despite their greater hedonic valence for cannabinoid agonists, Lister Hooded rats do not exhibit stronger long-term deleterious effects on cognition as measured using both the object recognition and object location tasks; indeed, the results suggest that Lister Hooded rats are less sensitive than Wistar rats to the long-term deleterious effects of cannabinoid agonists on spatial working memory measured using the object location task. In addition, we found that cannabinoid exposure during adulthood in either strain had no long-term consequences on spatial working memory. Using the object location task, we also observed that the vehicle-treated Wistar rats of both ages (adolescent and adult) but not the vehicle-treated Lister Hooded rats were unable to discriminate between the two object locations when the delay was increased to 120 min, suggesting that Lister Hooded rats perform better than Wistar rats with respect to spatial working memory. This higher spatial working memory performance of Lister Hooded rats was reported previously using an eight-arm radial maze, showing that Lister Hooded rats have fewer reference working memory errors than Wistar rats (Manahan-Vaughan and Schwegler 2011).

Our results are consistent with other studies demonstrating that residual memory deficits are more pronounced in adolescent (PND 30–50) CP55,940-treated rats tested at adulthood in the object recognition task than adult (PND 56–76) CP55,940-treated rats (O'Shea et al. 2004). In addition, cannabinoid exposure impaired spatial performance in adolescent (PND 30–40) but not adult (PND 70) rats measured using a radial arm maze (Fehr et al. 1976; Stiglick and Kalant 1982). Similarly, the administration of Δ^9 -THC, the principal psychoactive constituent of the cannabis plant, during early adolescence (PND 22–40) compared to late adolescence (PND 41–60) impaired reversal learning measured using the active place avoidance task (Harte and Dow-Edwards 2010). Our results are also consistent with studies in humans regarding age-related cannabis exposure showing that early-onset cannabis users (before the age of 17 years) compared to late-onset users (over the age of 17) exhibit more cognitive deficits in attentional functions, executive functioning, short-term memory and verbal fluency at adulthood (Pope et al. 2001; Schwartz et al. 1989; Solowij and Battisti 2008). Thus, our data strengthen the conclusion that adolescence is a vulnerable period with respect to the adverse effects of cannabinoid treatment on cognitive processes.

The long-term deleterious effects induced by adolescent exposure to CP 55,940 on performance on both the object recognition and object location tasks could result from a perturbation in the normal development and/or maturation

of the various brain regions or pathways that have been specifically implicated in those memory tasks. First, CB1 receptors are expressed primarily in the hippocampus, basal ganglia, cerebral cortex, nucleus accumbens (NAcc), amygdala and cerebellum (Glass et al. 1997; Herkenham et al. 1990; Tsou et al. 1998), and fluctuations in endocannabinoid levels were observed during adolescence, particularly in the regions that are important for motivation, reward and cognition (Ellgren et al. 2008). Moreover, considerable variations in cannabinoid receptor density have been observed around adolescence, with a progressive increase in cannabinoid binding sites in the limbic system, striatum and ventral mesencephalon in male rats. The number of binding sites reached a maximum on PND 40 before decreasing until adulthood at PND 70 (Rodriguez de Fonseca et al. 1993). Thus, modifications in RCB1 functioning and/or expression produced by adolescent CP exposure within a brain region implicated in object recognition and location could result in long-term cognitive deficits. In addition, intrinsic differences in CB1 receptor function and/or expression in these select brain areas were observed between various mouse and rat strains (Chakrabarti et al. 1998; Ortiz et al. 2004; Vinod et al. 2008), and these differences can potentially explain the subtle differences that we observed between the Wistar and Lister rats in the object location test.

Secondly, regarding the brain regions, a number of studies have shown that the novel object preference task may invoke the participation of a large network of cortical connections between the perirhinal cortex, the prefrontal cortex and the NAcc (Aggleton et al. 1997; Akirav and Maroun 2006; Ennaceur and Aggleton 1997; Horne et al. 2010; Warburton et al. 2000). Performance in the object location task, a spatial memory task, relies heavily on the hippocampus but also involves functional interactions with the brain areas that are involved in object recognition (including the prefrontal cortex, the perirhinal cortex and the NAcc) (Aggleton et al. 2004; Bussey et al. 2000; DeCoteau and Kesner 1998; Ennaceur and Aggleton 1997; Goodrich-Hunsaker et al. 2008; Warburton and Brown 2009). In addition, it was recently shown that both distinct subregions (e.g. core vs. shell) of the NAcc and the function of dopamine within these subregions of the NAcc play dissociable roles in the modulation of memory for objects and place (Nelson et al. 2010). Indeed, performance in the object location task was systematically related to dopamine levels in the shell, whereas performance in the object recognition task was related to dopamine in the core (Nelson et al. 2010). On the other hand, it is well established that dopamine neurotransmission in the shell of the NAcc plays an important role in cannabinoid reinforcement and rewarding effects (Carlezon and Wise 1996; Fadda et al. 2006; Ito et al. 2000). Studies using rat models of intracranial self-stimulation and place preference revealed that different

genetic strains of rats have different motivational responses to cannabinoids. Indeed, Lister Hooded rats but not Wistar rats display higher hedonic valence for RCB1 agonists, as they demonstrate a preference for cannabis (Gardner 2002; Lepore et al. 1995) and self-administer CB1 agonists (Deiana et al. 2007). Thus, the differences observed at adulthood in performance in the object location task between Lister Hooded and Wistar rats following adolescent exposure to cannabinoids could be related to differences in dopamine levels within the shell of the NAcc.

It has also been shown that catecholamine depletion within the infralimbic part of the prefrontal cortex perturbs performance in the object location task, suggesting that there might also be a role for infralimbic catecholamines in the integration of information regarding object location (Nelson et al. 2011). We previously showed in the lab that administration of the D1 agonist SKF 81297 improved the performance of rats in an object location task after a delay interval for which the trace strength of information is normally weakened (i.e. 4 h) primarily through changes in the phosphorylation states of CREB and DARPP-32 in the medial prefrontal cortex (Hotte et al. 2005; Hotte et al. 2007). Thus, abnormal dopaminergic functioning within the medial prefrontal cortex could also have led to the memory deficits that we observed in the object location task. In agreement with this hypothesis, Jentsch et al. (1998) showed reduced dopamine transmission in the medial prefrontal cortex after 1 week of withdrawal following 2 weeks of treatment with Δ^9 -THC (Jentsch et al. 1998).

Taken together, our data indicate that exposure of cannabinoids during adolescence but not during adulthood induces long-term persistent impairments in short-term and spatial memories, confirming that adolescence is a vulnerable period for the deleterious effects of cannabinoid. Adolescent exposure to CP 55,940 might perturb the normal development and/or maturation of the various brain regions and/or pathways that have been implicated in both object recognition and object location tasks, thereby resulting in long-term deleterious effects. Moreover, we also found that despite their higher hedonic valence for cannabinoid agonists, Lister Hooded rats do not develop more long-term deleterious memory deficits than Wistar rats. These results suggest that the strain-dependent differences that were observed with respect to the effects of adolescent cannabis exposure on memory performance might be related to a multitude of cellular, biochemical and physiological mechanisms (Harris and Nestler 1996; Honda et al. 1990; Prior et al. 1997; Strohl and Thomas 1997).

Acknowledgments This study was supported by funds from the French National Research Agency (ANR-06-NEURO-044-01). We thank Julie Cognet for her technical assistance.

Conflict of interest All authors declare that they have no conflicts of interest

References

- Aggleton JP, Keen S, Warburton EC, Bussey TJ (1997) Extensive cytotoxic lesions involving both the rhinal cortices and area TE impair recognition but spare spatial alternation in the rat. *Brain Res Bull* 43:279–287
- Aggleton JP, Kyd RJ, Bilkey DK (2004) When is the perirhinal cortex necessary for the performance of spatial memory tasks? *Neurosci Biobehav Rev* 28:611–624
- Akirav I, Maroun M (2006) Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cereb Cortex* 16:1759–1765
- Andersen SL (2003) Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev* 27:3–18
- Ashtari M, Avants B, Cyckowski L, Cervellione KL, Roofeh D, Cook P, Gee J, Sevy S, Kumra S (2011) Medial temporal structures and memory functions in adolescents with heavy cannabis use. *J Psychiatr Res* 45:1055–1066
- Ashton CH (2001) Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. *Br J Psychiatry* 178:101–106
- Bussey TJ, Duck J, Muir JL, Aggleton JP (2000) Distinct patterns of behavioural impairments resulting from fornix transection or neurotoxic lesions of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat. *Behav Brain Res* 111:187–202
- Carlezon WA Jr, Wise RA (1996) Rewarding actions of phencyclidine and related drugs in nucleus accumbens shell and frontal cortex. *J Neurosci* 16:3112–3122
- Casey BJ, Giedd JN, Thomas KM (2000) Structural and functional brain development and its relation to cognitive development. *Biol Psychol* 54:241–257
- Chakrabarti A, Ekuta JE, Onaivi ES (1998) Neurobehavioral effects of anandamide and cannabinoid receptor gene expression in mice. *Brain Res Bull* 45:67–74
- Chaperon F, Soubrie P, Puech AJ, Thiebot MH (1998) Involvement of central cannabinoid (CB1) receptors in the establishment of place conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 135:324–332
- Chechik G, Meilijson I, Ruppin E (1999) Neuronal regulation: a mechanism for synaptic pruning during brain maturation. *Neural Comput* 11:2061–2080
- DeCoteau WE, Kesner RP (1998) Effects of hippocampal and parietal cortex lesions on the processing of multiple-object scenes. *Behav Neurosci* 112:68–82
- Deiana S, Fattore L, Spano MS, Cossu G, Porcu E, Fadda P, Fratta W (2007) Strain and schedule-dependent differences in the acquisition, maintenance and extinction of intravenous cannabinoid self-administration in rats. *Neuropharmacology* 52:646–654
- Ellgren M, Artmann A, Tkalych O, Gupta A, Hansen HS, Hansen SH, Devi LA, Hurd YL (2008) Dynamic changes of the endogenous cannabinoid and opioid mesocorticolimbic systems during adolescence: THC effects. *Eur Neuropsychopharmacol* 18:826–834
- Ennaceur A, Aggleton JP (1997) The effects of neurotoxic lesions of the perirhinal cortex combined to fornix transection on object recognition memory in the rat. *Behav Brain Res* 88:181–193
- Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31:47–59
- Fadda P, Scherma M, Spano MS, Salis P, Melis V, Fattore L, Fratta W (2006) Cannabinoid self-administration increases dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuroreport* 17:1629–1632
- Fehr KA, Kalant H, LeBlanc AE (1976) Residual learning deficit after heavy exposure to cannabis or alcohol in rats. *Science* 192:1249–1251
- Gardner EL (2002) Addictive potential of cannabinoids: the underlying neurobiology. *Chem Phys Lipids* 121:267–290
- Glass M, Dragunow M, Faull RL (1997) Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 77:299–318
- Gonzalez S, Cebeira M, Fernandez-Ruiz J (2005) Cannabinoid tolerance and dependence: a review of studies in laboratory animals. *Pharmacol Biochem Behav* 81:300–318
- Goodrich-Hunsaker NJ, Howard BP, Hunsaker MR, Kesner RP (2008) Human topological task adapted for rats: Spatial information processes of the parietal cortex. *Neurobiol Learn Mem* 90:389–394
- Harris HW, Nestler EJ (1996) Immunohistochemical studies of mesolimbic dopaminergic neurons in Fischer 344 and Lewis rats. *Brain Res* 706:1–12
- Harte LC, Dow-Edwards D (2010) Sexually dimorphic alterations in locomotion and reversal learning after adolescent tetrahydrocannabinol exposure in the rat. *Neurotoxicol Teratol* 32:515–524
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1932–1936
- Higuera-Matas A, Botreau F, Miguens M, Del Olmo N, Borcel E, Perez-Alvarez L, Garcia-Lecumberri C, Ambrosio E (2009) Chronic periadolescent cannabinoid treatment enhances adult hippocampal PSA-NCAM expression in male Wistar rats but only has marginal effects on anxiety, learning and memory. *Pharmacol Biochem Behav* 93:482–490
- Honda H, Shibuya T, Salafsky B (1990) Brain synaptosomal Ca²⁺ uptake: comparison of Sprague–Dawley, Wistar–Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Comp Biochem Physiol B* 95:555–558
- Horne MR, Iordanova MD, Albasser MM, Aggleton JP, Honey RC, Pearce JM (2010) Lesions of the perirhinal cortex do not impair integration of visual and geometric information in rats. *Behav Neurosci* 124:311–320
- Hotte M, Naudon L, Jay TM (2005) Modulation of recognition and temporal order memory retrieval by dopamine D1 receptor in rats. *Neurobiol Learn Mem* 84:85–92
- Hotte M, Thuault S, Dineley KT, Hemmings HC Jr, Nairn AC, Jay TM (2007) Phosphorylation of CREB and DARPP-32 during late LTP at hippocampal to prefrontal cortex synapses in vivo. *Synapse* 61:24–28
- Ito R, Dalley JW, Howes SR, Robbins TW, Everitt BJ (2000) Dissociation in conditioned dopamine release in the nucleus accumbens core and shell in response to cocaine cues and during cocaine-seeking behavior in rats. *J Neurosci* 20:7489–7495
- Jentsch JD, Verrico CD, Le D, Roth RH (1998) Repeated exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol reduces prefrontal cortical dopamine metabolism in the rat. *Neurosci Lett* 246:169–172
- Lepore M, Vorel SR, Lowinson J, Gardner EL (1995) Conditioned place preference induced by delta 9-tetrahydrocannabinol: comparison with cocaine, morphine, and food reward. *Life Sci* 56:2073–2080
- Manahan-Vaughan D, Schwegler H (2011) Strain-dependent variations in spatial learning and in hippocampal synaptic plasticity in the dentate gyrus of freely behaving rats. *Front Behav Neurosci* 5:7
- McGregor IS, Issakidis CN, Prior G (1996) Aversive effects of the synthetic cannabinoid CP 55,940 in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 53:657–664
- Nelson AJ, Cooper MT, Thur KE, Marsden CA, Cassaday HJ (2011) The effect of catecholaminergic depletion within the prelimbic and infralimbic medial prefrontal cortex on recognition memory for recency, location, and objects. *Behav Neurosci* 125:396–403
- Nelson AJ, Thur KE, Marsden CA, Cassaday HJ (2010) Dissociable roles of dopamine within the core and medial shell of the nucleus accumbens in memory for objects and place. *Behav Neurosci* 124:789–799

- O'Shea M, McGregor IS, Mallet PE (2006) Repeated cannabinoid exposure during perinatal, adolescent or early adult ages produces similar longlasting deficits in object recognition and reduced social interaction in rats. *J Psychopharmacol* 20:611–621
- O'Shea M, Singh ME, McGregor IS, Mallet PE (2004) Chronic cannabinoid exposure produces lasting memory impairment and increased anxiety in adolescent but not adult rats. *J Psychopharmacol* 18:502–508
- Ortiz S, Oliva JM, Perez-Rial S, Palomo T, Manzanares J (2004) Differences in basal cannabinoid CB1 receptor function in selective brain areas and vulnerability to voluntary alcohol consumption in Fawn Hooded and Wistar rats. *Alcohol Alcohol* 39:297–302
- Pandolfo P, Vendruscolo LF, Sordi R, Takahashi RN (2009) Cannabinoid-induced conditioned place preference in the spontaneously hypertensive rat—an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *Psychopharmacology (Berl)* 205:319–326
- Paus T, Zijdenbos A, Worsley K, Collins DL, Blumenthal J, Giedd JN, Rapoport JL, Evans AC (1999) Structural maturation of neural pathways in children and adolescents: in vivo study. *Science* 283:1908–1911
- Pope HG Jr, Gruber AJ, Yurgelun-Todd D (2001) Residual neuropsychologic effects of cannabis. *Curr Psychiatry Rep* 3:507–512
- Prior H, Schwegler H, Ducker G (1997) Dissociation of spatial reference memory, spatial working memory, and hippocampal mossy fiber distribution in two rat strains differing in emotionality. *Behav Brain Res* 87:183–194
- Quinn HR, Matsumoto I, Callaghan PD, Long LE, Arnold JC, Gunasekaran N, Thompson MR, Dawson B, Mallet PE, Kashem MA, Matsuda-Matsumoto H, Iwazaki T, McGregor IS (2008) Adolescent rats find repeated Delta(9)-THC less aversive than adult rats but display greater residual cognitive deficits and changes in hippocampal protein expression following exposure. *Neuropsychopharmacology* 33:1113–1126
- Rodríguez de Fonseca F, Ramos JA, Bonnín A, Fernández-Ruiz JJ (1993) Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. *Neuroreport* 4:135–138
- Rubino T, Realini N, Braidà D, Guidi S, Capuro V, Vigano D, Guidali C, Pinter M, Sala M, Bartesaghi R, Parolaro D (2009) Changes in hippocampal morphology and neuroplasticity induced by adolescent THC treatment are associated with cognitive impairment in adulthood. *Hippocampus* 19:763–772
- Schneider M, Koch M (2003) Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid treatment impairs sensorimotor gating, recognition memory, and the performance in a progressive ratio task in adult rats. *Neuropsychopharmacology* 28:1760–1769
- Schneider M, Koch M (2005) Deficient social and play behavior in juvenile and adult rats after neonatal cortical lesion: effects of chronic pubertal cannabinoid treatment. *Neuropsychopharmacology* 30:944–957
- Schwartz RH, Gruenewald PJ, Klitzner M, Fedio P (1989) Short-term memory impairment in cannabis-dependent adolescents. *Am J Dis Child* 143:1214–1219
- Solowij N, Battisti R (2008) The chronic effects of cannabis on memory in humans: a review. *Curr Drug Abuse Rev* 1:81–98
- Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24:417–463
- Stiglick A, Kalant H (1982) Learning impairment in the radial-arm maze following prolonged cannabis treatment in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 77:117–123
- Strohl KP, Thomas AJ (1997) Neonatal conditioning for adult respiratory behavior. *Respir Physiol* 110:269–275
- Tarazi FI, Tomasini EC, Baldessarini RJ (1998) Postnatal development of dopamine and serotonin transporters in rat caudate-putamen and nucleus accumbens septi. *Neurosci Lett* 254:21–24
- Tarazi FI, Tomasini EC, Baldessarini RJ (1999) Postnatal development of dopamine D1-like receptors in rat cortical and striatolimbic brain regions: an autoradiographic study. *Dev Neurosci* 21:43–49
- Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83:393–411
- Vinod KY, Yalamanchili R, Thanos PK, Vadasz C, Cooper TB, Volkow ND, Hungund BL (2008) Genetic and pharmacological manipulations of the CB(1) receptor alter ethanol preference and dependence in ethanol preferring and nonpreferring mice. *Synapse* 62:574–581
- Warburton EC, Baird AL, Morgan A, Muir JL, Aggleton JP (2000) Disconnecting hippocampal projections to the anterior thalamus produces deficits on tests of spatial memory in rats. *Eur J Neurosci* 12:1714–1726
- Warburton EC, Brown MW (2009) Findings from animals concerning when interactions between perirhinal cortex, hippocampus and medial prefrontal cortex are necessary for recognition memory. *Neuropsychologia* 48:2262–2272
- Yamaguchi K, Kandel DB (1984) Patterns of drug use from adolescence to young adulthood: III. Predictors of progression. *Am J Public Health* 74:673–681

Résultats complémentaires non présentés dans l'article 1

Nous avons également évalué chez les rats Wistar et Lister Hooded (LH), les effets à long terme d'une exposition au CP durant l'adolescence sur des paradigmes comportementaux permettant de mettre en évidence des comportements anormaux s'apparentant aux symptômes de la schizophrénie, de l'anxiété et de la dépression. Ainsi, la dimension psychotique a été évaluée en mesurant le filtrage des informations sensorielles des animaux par le test du PPI. La dimension anxieuse a été étudiée en mesurant le niveau d'anxiété des animaux dans le test du labyrinthe en croix surélevée. Enfin, un test d'interaction sociale a également été utilisé afin de rechercher des anomalies des comportements sociaux pouvant s'apparenter à l'anhédonie sociale qui peut être observée chez les patients schizophrènes ou dépressifs. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous.

1) Test de l'inhibition de la réaction de sursaut par le prépulse sonore (PPI)

La plupart des patients schizophrènes (80-90%) présentent un déficit de filtrage de l'information sensorielle exploré par l'inhibition du réflexe de sursaut par un préstimulus (Braff et al. 2001b). Nous avons exploré le filtrage de l'information sensori-motrice chez les rats exposés au CP durant l'adolescence grâce au test du PPI. Le principe de ce test est d'évaluer la diminution du sursaut à un stimulus sonore qui est engendrée par la présentation préalable d'un son (prépulse) de plus faible intensité.

Le test a été réalisé grâce à un appareillage de type SR-LAB (San Diego Instruments, Etats-Unis). Les rats sont positionnés individuellement dans un cylindre en plexiglas transparent (diamètre 8,9 cm et longueur de 20 cm), fixé sur une plateforme sensible aux mouvements de l'animal, à l'intérieur d'une chambre de « startle ». Un haut parleur est fixé à 20 cm du cylindre. Pendant tout le test, un bruit de fond de 68 dB est maintenu dans la chambre de « startle ». Le test commence par 5 minutes d'acclimatation à l'enceinte du test et au bruit de fond (68 dB). Ensuite, sont présentés à l'animal 10 pulses seuls (120 dB, 40 ms) et de façon aléatoire 10 combinaisons de différents stimuli (pulse, prépulse, ou prépulse/pulse). Il existe 4 intensités de prépulses (20 ms): 72 dB, 76 dB, 80 dB, 84 dB, soit 10 stimuli différents au total. L'intervalle de temps entre les différents stimuli est de 15 à 20 secondes, tandis qu'il est de 100 ms entre le début du prépulse et le pulse. L'amplitude des sursauts engendrés par la présentation des différents stimuli acoustiques est enregistrée. Le pourcentage d'inhibition par le prépulse (%PPI) est défini comme la réduction de l'amplitude du sursaut en présence du prépulse sonore comparativement à celle obtenue sans prépulse sonore.

$$PPI(X) = \frac{[(\text{Moyenne Intensité sursaut 120 dB}) - (\text{Moyenne Intensité sursaut X})] \times 100}{(\text{Moyenne Intensité sursaut 120 dB})}$$

(X est l'intensité du prépulse).

Une analyse statistique ANOVA multifactorielle (souche, traitement et intensité du prépulse) avec mesures répétées sur le facteur prépulse des données a été réalisée.

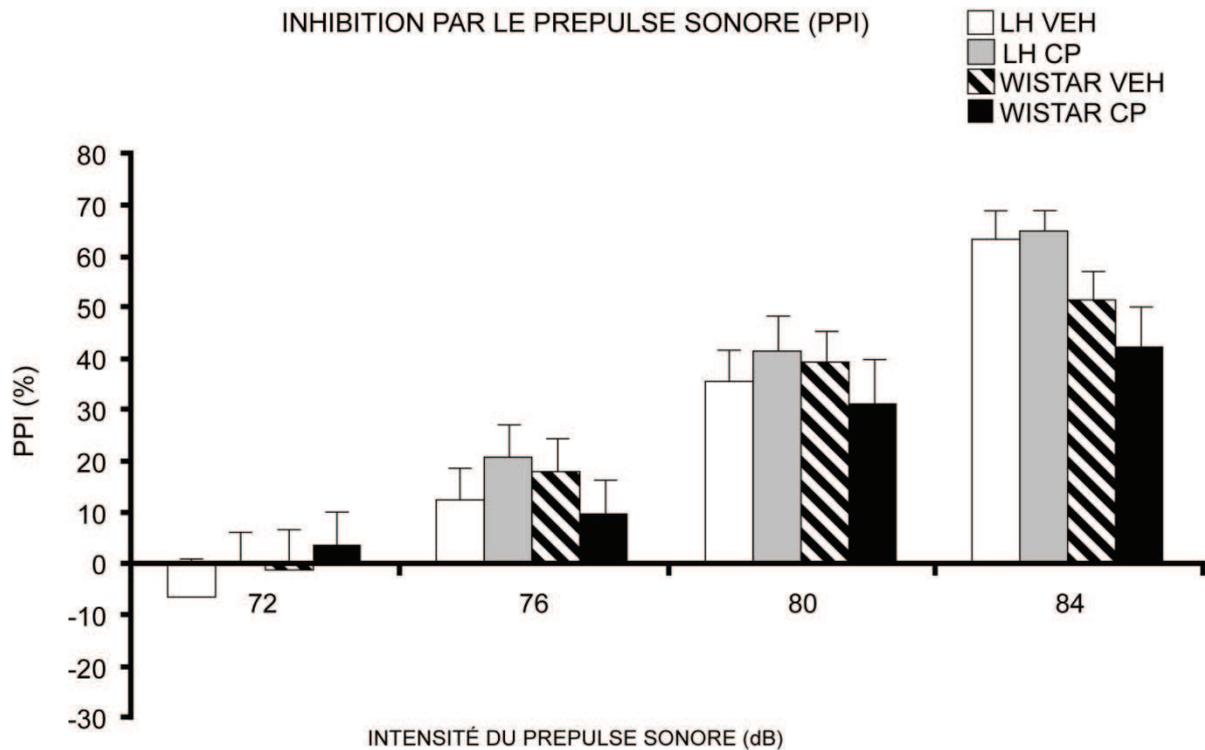


Figure 1 : Test de l'inhibition du reflexe de sursaut par le prépulse sonore (PPI). Evaluation du filtrage sensoriel des rats Wistar et des rats Lister Hooded testés à l'âge adulte après un traitement chronique au CP55, 940 (CP) ou avec la solution véhicule (VEH) durant l'adolescence (JPN29 à 50). Pulse de 120 dB, prépulses de 72, 76, 80 et 84 dB. Le nombre d'animaux par groupe est de 12.

L'analyse globale des données révèle que les rats Wistar et Lister Hooded présentent des niveaux de PPI similaires [$F(1, 42) = 0,9; p > 0,05$]. L'exposition au CP pendant l'adolescence n'a pas de répercussions à long terme sur le PPI et cela quelle que soit la souche de rat étudiée comme l'indique l'absence d'interaction (souche x CP) [$F(1, 42) = 1,34; p > 0,05$]. Cependant l'analyse révèle que l'augmentation classique du PPI avec l'intensité du prépulse [$F(3, 126) = 85,8; p < 0,001$] présente des profils différents chez les deux souches de rats (interaction (souche x intensité) du prépulse significative) [$F(3, 126) = 2,75; p < 0,05$]. En effet, à l'intensité de prépulse de 84 dB, les rats Wistar (exposés ou non au CP) présentent des niveaux de PPI significativement inférieurs à ceux des rats Lister Hooded [$F(1, 42) = 9,73; p < 0,001$].

2) Le test du labyrinthe en croix surélevée

Ce test permet d'évaluer le niveau d'anxiété des animaux. Le dispositif utilisé est une croix surélevée à 60 cm au dessus du sol et composée d'une partie centrale (10 x 10 cm), de deux bras ouverts (10 cm x 50 cm, sans parois) et de deux bras fermés perpendiculaires aux bras ouverts (10 cm x 50 cm, avec des parois de 10 cm de hauteur). L'animal est placé au centre du

dispositif et est libre d'explorer l'ensemble du dispositif pendant une période de 10 minutes. Le temps passé par le rat dans chacun des bras du dispositif est enregistré grâce à un système de type vidéotracking (Viewpoint, France). Les bras ouverts du dispositif sont anxiogènes pour l'animal. Ainsi, si le rat les explore beaucoup, il sera décrit comme peu anxieux, alors que s'il reste dans les bras fermés, il sera considéré comme plus anxieux. L'indice d'anxiété est défini comme le pourcentage (%) de temps passé dans les bras ouverts par rapport au % de temps passé dans les bras ouverts et fermés. Une analyse ANOVA multifactorielle (souche et traitement) des données a été réalisée.

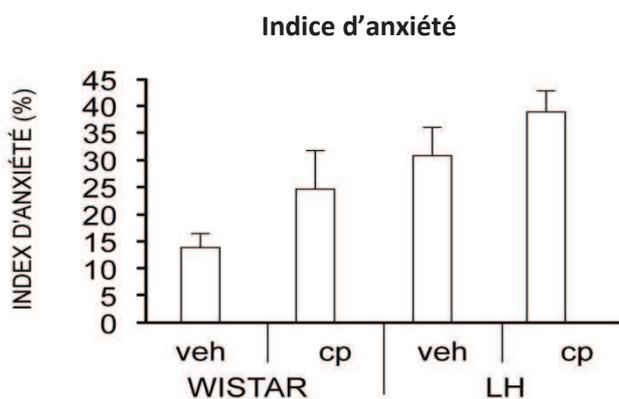


Figure 2 : Test du labyrinthe en croix surélevée. Mesure du niveau d'anxiété (représenté par l'indice d'anxiété) des rats Wistar et des rats Lister Hooded testés à l'âge adulte après un traitement chronique au CP55, 940 (CP) ou avec la solution véhicule (VEH) durant l'adolescence (JPN 29 à 50). Le nombre d'animaux par groupe est de 12.

L'analyse des données indique que l'exposition au CP durant l'adolescence n'entraîne aucune modification des niveaux d'anxiété chez les rats Wistar et Lister Hooded testés à l'âge adulte ($F(1, 43) = 0,36$; $p > 0,05$). Néanmoins, l'analyse permet de révéler des niveaux d'anxiété moindre chez les rats Lister Hooded comparativement aux rats Wistar [$F(1, 43) = 14,5$; $p < 0,001$].

3) Le test de l'activité locomotrice

L'activité locomotrice spontanée des animaux a été enregistrée sur une période de 60 minutes dans un open field (80 x 80 x 50 cm) grâce à un système de type vidéotracking (Viewpoint, France). La variable mesurée est la distance totale parcourue par l'animal. Une analyse ANOVA multifactorielle (souche et traitement) des données a été réalisée.

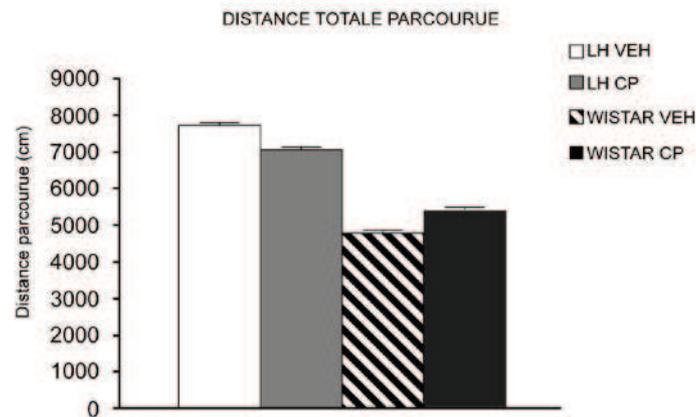


Figure 3 : Test de l'activité locomotrice. Mesure de la distance totale parcourue sur une période de 60 minutes des rats Wistar et des rats Lister Hooded testés à l'âge adulte après un traitement chronique au CP55, 940 (CP) ou avec la solution véhicule (VEH) durant l'adolescence (JPN 29 à 50). Le nombre d'animaux par groupe est de 12.

L'analyse des données indique que l'exposition au CP durant l'adolescence n'entraîne aucune modification de l'activité locomotrice des rats testés à l'âge adulte [$F(1, 43) = 0,0033$; $p > 0,05$] et cela quelle que soit la souche de rat étudiée (Wistar et Lister Hooded) [$F(1, 43) = 1,337$; $p > 0,05$]. Néanmoins, l'analyse permet de révéler une activité locomotrice moindre chez les rats Wistar comparativement aux rats Lister Hooded [$F(1, 43) = 17,81$; $p < 0,001$], démontrant un comportement hyperactif spontané chez les rats Lister Hooded.

4) Le test de l'interaction sociale

Le comportement social des animaux a été évalué dans le test d'interaction sociale qui est réalisé dans un open field (50 x 50 x 45 cm). Deux animaux de même souche, de même traitement, de poids similaires et provenant de cages différentes sont exposés ensemble pour une période de 10 minutes. Le temps et le nombre de contacts ont été mesurés via le logiciel de suivi vidéo (Videotrack, Viewpoint, France). Un contact est défini lorsque la distance entre les centres de gravité des animaux est inférieure à 20 cm. Une analyse statistique ANOVA multifactorielle (traitement, souche) des données a été réalisée.

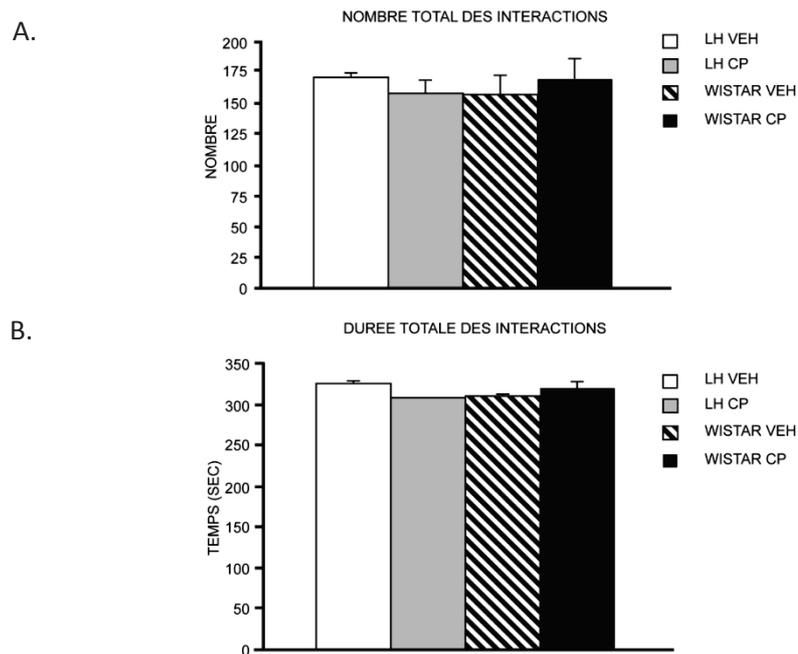


Figure 4 : Test de l'interaction sociale. Evaluation du comportement social des rats Wistar (groupe VEH n=6 ; groupe CP55, 940 n=5) et des rats Lister Hooded (groupe VEH n=6 ; groupe CP55, 940 n=5) testés à l'âge adulte. Des rats non familiers de même groupe, de même souche et de même poids sont exposés ensemble durant 10 min.

A) Nombre total des interactions B) Durée totale des interactions.

Le traitement au CP 55, 940 durant l'adolescence n'affecte ni le nombre, ni la durée des contacts sociaux des rats testés à l'âge adulte [F (1, 19) = 0,001 et 0,12 respectivement; $p > 0,05$] et ce quelle que soit la souche de rat étudiée comme l'indique l'absence d'interaction (souche x CP) pour les deux paramètres étudiés. L'analyse révèle également que le nombre et la durée des contacts sociaux sont similaires chez les rats Wistar et les rats Lister Hooded [F (1, 19) = 0,01 et 0,03 respectivement; $p > 0,05$]

Conclusions

Outre les déficits cognitifs mis en évidence chez les deux souches de rats testées (article 1), ces résultats complémentaires montrent que le traitement au CP durant l'adolescence n'entraîne pas de conséquences à long terme sur (1) le filtrage de l'information sensori-motrice, (2) les niveaux d'anxiété, (3) l'activité locomotrice et (4) les comportements d'interaction sociale chez les rats Wistar et les rats Lister Hooded testés à l'âge adulte.

Les données que nous avons obtenues sur l'absence de différence significative dans le test de l'inhibition par pré-stimuli du réflexe de sursaut sont contradictoires par rapport à celles obtenues par l'équipe de Schneider et Koch (2003). En effet, ces auteurs mettent en évidence des déficits durables du filtrage des informations sensorielles après une exposition au WIN55, 212-2 durant l'adolescence (JPN 40 à 65) (Schneider and Koch 2003). Dans notre étude, le test de PPI a été réalisé 76 jours après la fin du traitement alors que Schneider et Koch ont mis en évidence des déficits encore 85 jours après l'arrêt de leur traitement par le WIN55,212-2.

Cependant, certaines différences au sein des deux protocoles utilisés peuvent justifier les différents résultats obtenus quant aux effets à long terme des cannabinoïdes. D'une part, l'agoniste RCB1 utilisé par Schneider et Koch est le WIN55, 212-2 et les injections de cet agoniste sont réalisées à concentration constante (1,2 mg/kg) mais de façon irrégulière sur la période s'étalant du 40^{ème} au 65^{ème} JPN. A l'inverse, dans notre étude les animaux recevaient quotidiennement des doses croissantes de CP55, 940 (0,15 ; 0,20 et 0,30 mg/kg) du 29^{ème} au 50^{ème} JPN.

Cependant lors des études pilotes, nous avons comparé les effets du WIN55, 212-2 et du CP55, 940 en suivant la procédure expérimentale décrite par Schneider et Koch sans pouvoir reproduire les déficits de PPI, aussi bien 30 jours que 44 jours après la dernière injection. Enfin, notons que les résultats contradictoires des études menées par Schneider et Koch sont issus de rats qui provenaient de leur propre élevage et qu'à ce jour aucune équipe n'a pu répliquer ces résultats.

Nous n'avons pas mis en évidence de déficits d'interaction sociale chez les rats exposés au CP durant l'adolescence et testés à l'âge adulte. Ces données s'opposent également à celles obtenues par d'autres auteurs qui ont montré des déficits d'interaction sociale respectivement 15 jours après un traitement chronique par le THC (de JPN 32 à 48) (Quinn et al. 2008) et 23 jours après l'arrêt d'un traitement chronique par le CP (de JPN 30 à 51) (O'Shea et al. 2004). Le délai après la fin du traitement au CP (51 jours), dans nos expériences pourrait expliquer cette absence d'effets.

De même, dans le test du labyrinthe en croix surélevée, nous n'avons pas mis en évidence d'effets à long terme sur les niveaux d'anxiété des rats traités au CP durant l'adolescence. Ces résultats s'opposent également à certaines données de la littérature, qui de façon surprenante avaient démontré dans ce test, un effet anxiolytique à long terme. En effet, il a été montré que des rats Wistar exposés au CP (0.4 mg/kg) de JPN 28 à 38 passaient plus de temps dans les bras ouverts comparativement à des rats VEH lorsqu'ils étaient testés 59 jours après la dernière exposition (Higuera-Matas et al. 2009). Ce même effet, a également été retrouvé chez des rats Wistar 37 jours après la fin d'un traitement au CP (0.4 mg/kg) délivré de JPN 35 à 45 (Biscaia et al. 2003). Nous avons réalisé ce test plus de 90 jours après la fin du traitement et ce, après plusieurs manipulations des rats, ce qui a pu interférer avec un potentiel effet anxiolytique à long terme chez les animaux.

Aucun déficit de l'activité n'a pu être mesuré dans l'open field chez les rats exposés au CP durant l'adolescence et testés à l'âge adulte. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes où des traitements chroniques avec le CP (0.4 mg/kg) de JPN 28 à 38, et également le WIN55, 212-2 (1.2mg/kg) de JPN 40 à 65 ou le THC (5mg/kg) de JPN 35 à 45 n'entraînent pas de modification de l'activité locomotrice mesurée chez les rats testés à l'âge adulte. Le traitement aux cannabinoïdes durant l'adolescence chez le Rat ne semble pas affecter l'activité locomotrice à l'âge adulte (Higuera-Matas et al. 2009; Quinn et al. 2008; Schneider and Koch 2003).

Article 2: Chronic cannabinoid exposure during adolescence causes long- term synaptic and structural changes in rat prefrontal cortex.

Justine Renard, Tania Vitalis, Marion Rame, Marie-Odile Krebs, Gwenaëlle Le Pen, Thérèse M Jay

En préparation (pour soumission prochaine)

Contexte

L'adolescence représente une phase importante de développement pendant laquelle le système endocannabinoïde joue un rôle important dans la régulation des systèmes de neurotransmission et dans la plasticité synaptique, contribuant à la maturation du système nerveux. Nous avons démontré que l'exposition à l'agoniste cannabinoïde CP55, 940 durant l'adolescence chez le Rat (JPN 29 à 50) entraîne des déficits cognitifs durables à l'âge adulte (Renard et al. 2012). L'adolescence est une période critique pour les effets délétères des cannabinoïdes sur les fonctions cognitives et les mécanismes sous-jacents à ces déficits restent à être élucidés.

Objectifs

Dans cette étude, nous avons cherché à mettre en relation les déficits cognitifs induits à long terme par l'exposition aux cannabinoïdes durant l'adolescence chez le Rat avec des modifications structurales dans le CPF et l'hippocampe et/ou des altérations de la plasticité, de l'efficacité synaptique (PLT) au niveau du réseau hippocampe-CPF. Le CPF, de même que l'interaction du CPF avec l'hippocampe et sa dynamique, exercent un rôle important dans les fonctions cognitives complexes que l'on sait être altérées dans plusieurs pathologies psychiatriques dont la schizophrénie. Chez les rats adultes préalablement traités aux cannabinoïdes pendant l'adolescence et leurs contrôles, nous avons étudié (1) l'expression de la PLT induite dans la région médiane du CPF après stimulation de l'hippocampe ventral (2) la morphologie des neurones pyramidaux de la couche II/III du CPF (3) les niveaux d'expression de plusieurs marqueurs de plasticité présynaptique (VGLUT3, synaptophysine) et postsynaptique (PSD95) dans le CPF et l'hippocampe.

Résultats principaux

1) Le traitement chronique au CP durant l'adolescence diminue le maintien de la PLT hippocampe-CPF chez les rats à l'âge adulte

Les effets à long terme du traitement au CP durant l'adolescence sur la PLT hippocampe-CPF ont été évalués chez les rats adultes à partir de 42 jours après la fin du traitement. Chez les rats du groupe VEH, la stimulation à haute fréquence (HFS) appliquée dans la région CA1/subiculum induit une augmentation durable de l'amplitude des potentiels postsynaptiques (PPSE) enregistrés dans le CPF (Figure 1A.). Chez les rats du groupe CP on observe une augmentation significativement moins importante de l'amplitude de ces PPSE. Le déficit d'amplitude de la PLT est observé au cours de la phase tardive de la PLT (60 minutes HFS) ($t_{60-90 \text{ min}}: 120.71 \pm 7.12 \% \text{ vs. } 148.65 \pm 6.7 \% ; p < 0.05$ and $t_{90-120 \text{ min}}: 110.14 \pm 9.56 \% \text{ vs. } 146.71 \pm 6.54 \% ; p < 0.01$) (Figure 1B).

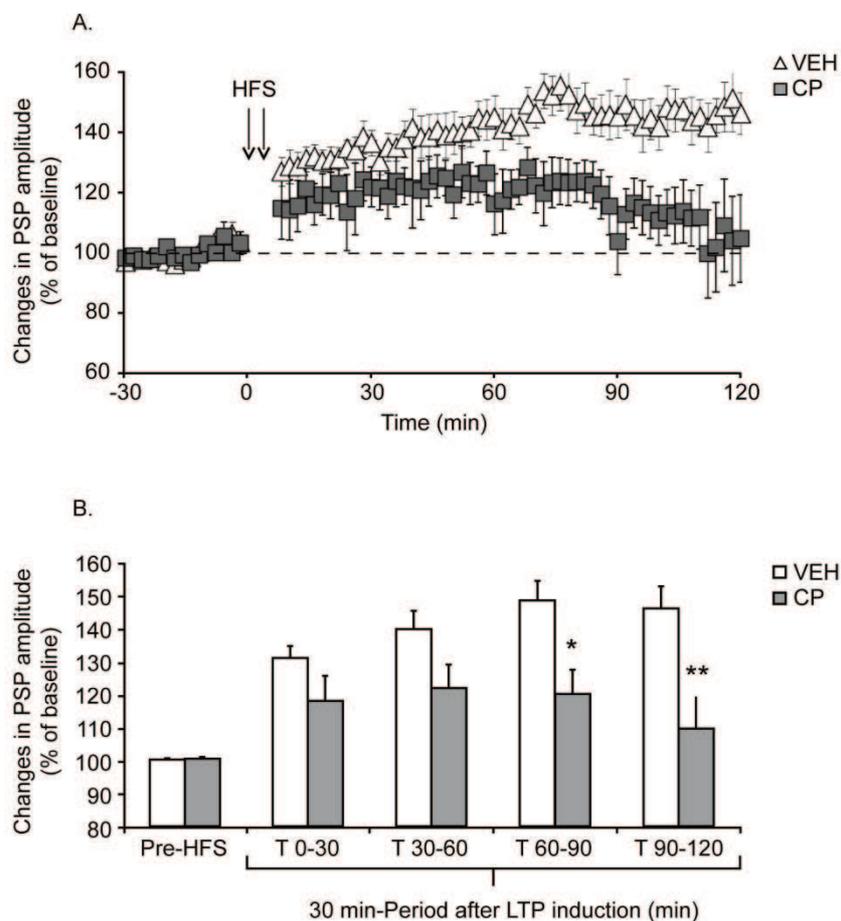


Figure 1 : Effets à long terme d'un traitement chronique au CP 55,940 durant l'adolescence sur l'expression de la PLT de la voie hippocampe-CPF chez les rats à l'âge adulte.

(A) Représentation graphique des changements d'amplitudes des potentiels postsynaptiques moyennés avant et après HFS.

(B) Représentation graphique des changements d'amplitudes des potentiels postsynaptiques moyennés par périodes successives de 30 minutes avant et après les HFS. One-way ANOVA, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, comparativement au groupe VEH.

2) Le traitement chronique au CP durant l'adolescence modifie la morphologie des neurones pyramidaux dans la couche II/III du CPF chez les rats à l'âge adulte

La morphologie des neurones pyramidaux de la couche II/III du CPF a été analysée 42 jours après l'arrêt du traitement chronique au CP durant l'adolescence. L'exposition au CP provoque une diminution significative du nombre total des dendrites [$F(1,47) = 47,987$; $p < 0,001$] et de la longueur totale des dendrites [$F(1,47) = 34,828$; $p < 0,001$] des neurones pyramidaux du CPF des rats adultes. Ces réductions concernent les dendrites basales [$F(1,47) = 23,859$ et $51,957$ respectivement pour la longueur totale et le nombre total ; $p < 0,001$] et non les dendrites apicales. D'autre part, l'exposition au CP a provoqué une diminution de la complexité dendritique (évaluée par le DCI) des dendrites basales des neurones pyramidaux du CPF des rats adultes [$F(1,47) = 43,370$; $p < 0,001$].

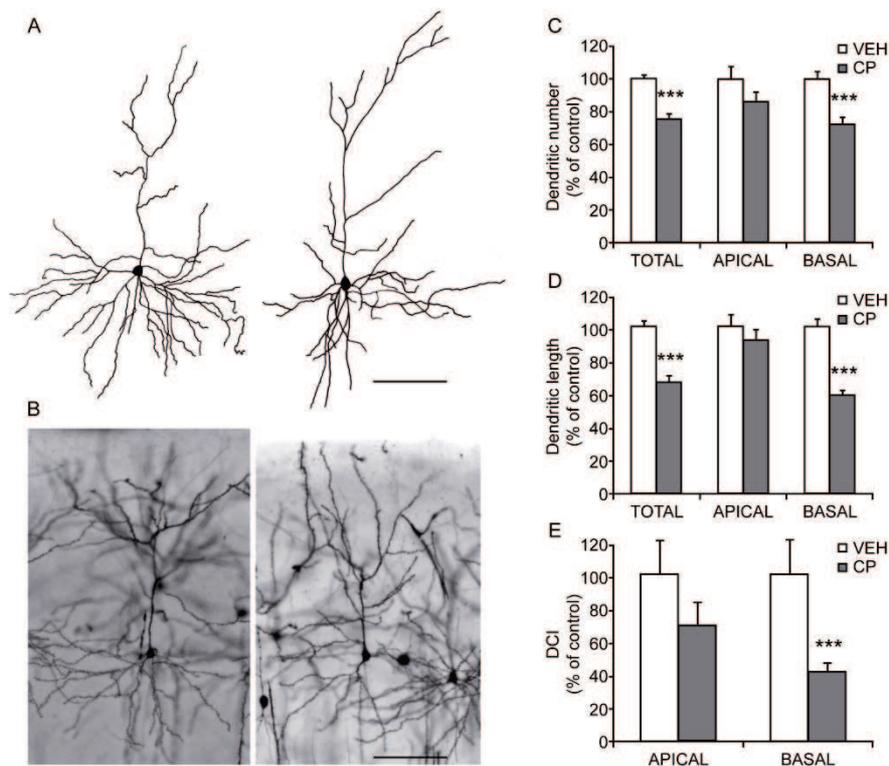


Figure 2 : Effets à long terme d'un traitement chronique au CP 55,940 durant l'adolescence sur la morphologie des neurones pyramidaux de la couche II/III du CPF des rats adultes.

(A) Exemples de reconstruction d'un neurone pyramidal de la couche II/III du CPF d'un rat traité au VEH durant l'adolescence (à gauche) et d'un rat traité au CP durant l'adolescence (à droite). Echelle 100 μ m.

(B) Photographies d'un neurone pyramidal de la couche II/III du CPF d'un rat traité au VEH durant l'adolescence (à gauche) et d'un rat traité au CP durant l'adolescence (à droite).

(C) Nombre de dendrites totales, basales et apicales des neurones pyramidaux de la couche II/III du CPF. (D) Longueur des dendrites totales, basales et apicales des neurones pyramidaux de la couche II/III du CPF. (E) Index de la complexité dendritique (DCI) des dendrites basales et apicales des neurones pyramidaux de la couche II/III du CPF. Analyse statistique ANOVA (one-way) *** $p < 0.001$, comparativement au groupe VEH.

3) Le traitement chronique au CP durant l'adolescence diminue l'expression de la protéine PSD95 (post-synaptic density 95) dans le CPF et pas dans l'hippocampe des rats à l'âge adulte

L'expression du marqueur postsynaptique PSD95 et des marqueurs présynaptiques synaptophysine et VGLUT3 a été analysée par Western blot dans le CPF et dans l'hippocampe des rats adultes, 42 jours après l'arrêt du traitement chronique au CP durant l'adolescence.

L'exposition au CP diminue significativement l'expression de PSD95 dans le CPF des rats adultes ($t(10) = 2,734$; $p < 0,05$) tandis qu'elle reste inchangée dans l'hippocampe ($t(10)=1,22$; $p > 0,05$). Aucune modification des niveaux d'expression des marqueurs présynaptiques VGLUT3 et synaptophysine n'est observée dans le CPF et dans l'hippocampe.

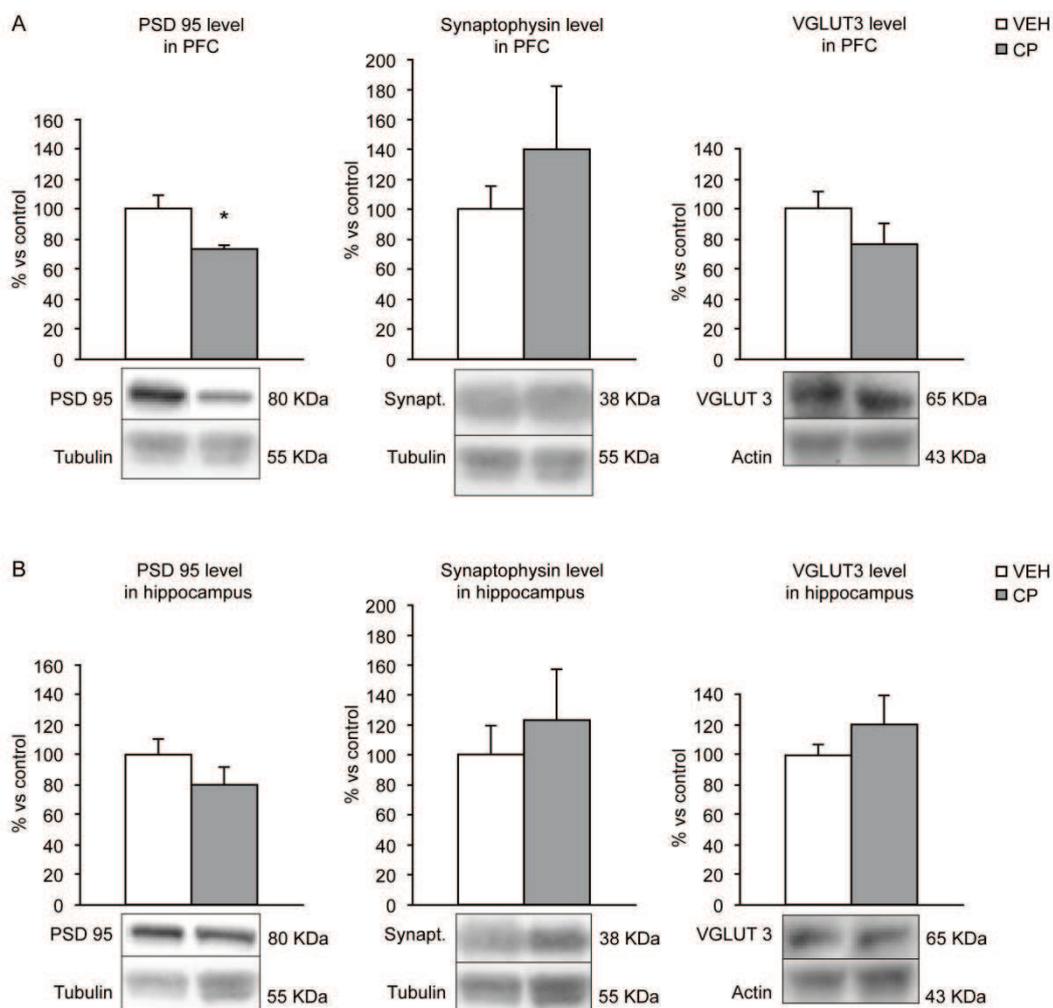


Figure 3 : Effets à long terme d'un traitement chronique au CP 55, 940 durant l'adolescence sur l'expression de la PSD95, de la synaptophysine et de VGLUT3 dans le CPF (A) et dans l'hippocampe (B) des rats à l'âge adulte. Les immunoblots représentent l'expression de PSD95 et synaptophysine normalisés par l'expression de l'actine et de VGLUT3 normalisée par l'expression de la tubuline. Test de Student * $p < 0,05$, comparativement au groupe VEH. Le nombre d'animaux par groupe est de 6.

**Chronic cannabinoid exposure during adolescence
causes long- term synaptic and structural changes
in rat prefrontal cortex.**

Justine Renard ^(1,2), Tania Vitalis ⁽³⁾, Marion Rame ^(1,2), Marie-Odile Krebs ^(1,2),
Gwenaëlle Le Pen ^(1,2), Thérèse M Jay ^{(1,2)*}

- (1) INSERM ; Laboratoire de “Physiopathologie des maladies Psychiatriques”, Centre de Psychiatrie et Neurosciences U894, Paris, France
- (2) Université Paris Descartes, Faculté de Médecine Paris Descartes, Service Hospitalo Universitaire, Centre Hospitalier Sainte-Anne, Paris, France
- (3) Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 7637, Laboratoire de Neurobiologie, Ecole supérieure de Physique et de Chimie Industrielles, Paris, France.

*Corresponding author: Dr Therese M Jay
INSERM U894
Centre de Psychiatrie et de Neurosciences
2ter rue d’Alésia
75014 Paris, France
Tel: +33 1 40 78 86 31
Fax: +33 1 45 80 72 93
Email : therese.jay@inserm.fr

Abstract

The adolescent period represents a critical phase of development in which the endocannabinoid system plays an important role in the regulation of neurotransmitter systems and synaptic plasticity. Given the continued neurodevelopment throughout adolescence, adolescents may be more vulnerable than adults to certain neural consequences of heavy cannabis use. In animals, a chronic exposition to cannabinoids during adolescence induces cognitive disorders similar to those observed in schizophrenia. We previously reported that chronic exposition with a synthetic cannabinoid agonist (CP55, 940) during adolescence in rats (postnatal days 29-50), not during adulthood (postnatal days 70-91), impaired performance in an object recognition task and in an object location task at adulthood, suggesting a persistent deficit in visual short-term and spatial working memories. We further investigate whether these memory impairments were associated with changes in synaptic plasticity and in the dendritic morphology of pyramidal neurons in the prefrontal cortex. Level of synaptic markers (PSD95, synaptophysin, VGLUT3) was also explored in the hippocampus and the prefrontal cortex. Results showed that chronic cannabinoid exposure during adolescence in rats induced (1) an alteration in the expression of hippocampal-prefrontal cortex synaptic plasticity (2) morphological modifications in dendritic arborizations of pyramidal neurons in layers II/III of the medial prefrontal cortex (3) significant changes in levels of some markers of neuroplasticity. These results improve our understanding about the functional, structural and molecular underpinnings of the long-term cognitive deficits induced by chronic cannabinoid exposure during adolescence in rats.

Keywords: Cannabinoid, Adolescence period, synaptic plasticity, synaptic markers, prefrontal cortex, Golgi-Cox staining.

Cannabis is the most widely abused illicit drug during adolescence between 12-17 years old (SAMHSA 2010). Human studies show that cannabis consumption during adolescence induces persistent brain and behavioural alterations that could lead to long-term cognitive disorders similar to those observed in schizophrenia (Arseneault et al. 2004; Semple et al. 2005). Similar to the effects of cannabis in humans, exposure to cannabinoid agonists during adolescence in rodents can lead to behavioral impairments at adulthood (O'Shea et al. 2004; Rubino et al. 2009; Schneider and Koch 2003; Schneider et al. 2008). The adolescent period represents a critical phase of development characterized by a strong neurobehavioural plasticity and specific neuroplastic modifications that occur in the prefrontal cortex (PFC) and limbic regions. These changes include dendritic spine density, development of myelination, synaptic pruning, receptor distribution, volumetric growth and programming of neurotrophic levels (Adriani et al. 2004; Andersen 2003; Giedd et al. 1999; Laviola et al. 1999; Quinn et al. 2008; Spear 2000). Synaptic rearrangements occurring during developmental periods are believed to support the acquisition of mature behaviour and the emergence of adult cognitive processes (Andersen 2003; Spear 2000). The endocannabinoid system is present and active during adolescence, where cannabinoid type 1 receptors (CB1Rs) undergo profound reorganization. Indeed, CB1R mRNA expression drops in all cortical areas during the adolescent transition to adulthood, most prominently in the limbic/associative cortex (prelimbic, infralimbic, and cingulate) to contribute to the maturation of the PFC (Heng et al. 2010). Moreover, CB1Rs are primarily recognized as key players in the regulation of both short-term and long-term forms of synaptic plasticity and play an important role for neurogenesis and synaptogenesis in the developing brain (Freund 2003; Harkany et al. 2008; Kreitzer and Regehr 2001).

The various developmental processes occurring in the endocannabinoid system during adolescence and its role in synaptic plasticity provide evidence that exposure to cannabinoids may interfere with the normal cortical maturation process taking place in the PFC and limbic regions. As a consequence, long-lasting alterations of neuronal structure and connectivity may occur in these brain areas that are critically involved in cognitive processes and in the pathogenesis of psychosis. We have previously shown, that chronic cannabinoid exposure during adolescence in rats (period extending from PND 29 to PND 50), but not in adulthood (period extending from PND 70 to PND 91) induced long-lasting deficits in short-term memory and in spatial working memory in adult rats (Renard et al. 2012). Here, we

investigate the functional, structural and molecular underpinnings of the observed deleterious cognitive phenotype in rats. We hypothesized that these memory deficits observed after chronic adolescent cannabinoid exposure might perturb the maturation of the neuronal network linking the hippocampus to the PFC. We tested these hypothesis with three series of experiments. In the first one, using electrophysiological procedure, we tested whether chronic adolescent cannabinoid alters the plasticity of the hippocampal-prefrontal network. In the second one, we determined whether changes in the dendritic morphology of pyramidal neurons of layers II/III pyramidal neurons occurred in the adult PFC. We also evaluated the effects of adolescent cannabinoid exposure on the expression levels of hippocampal and prefrontal synaptic proteins (PSD95, VGLUT3, synaptophysin) in the adult rats.

Materials and Methods

Animals

Male Wistar Han (Janvier) rats were obtained at 22 days postnatal (PND) with a weight of 77-128g. The rats were group-housed in Macrolon cages at four rats per cage with respect to their treatment status and under standard conditions on a 12h light-dark schedule (with the lights on from 7h00-19h00). The animals received free access to water and were fed ad libitum. All procedures were performed in accordance with National (JO 887-848) and European (86/609/EEC) legislation regarding animal experimentation. Three different batches of 40 animals were used for the experiments.

Drug preparation and administration

CP55,940 ((-)-cis-3-[2-hydroxy-4-(1,1-dimethylheptyl) phenyl]-Trans-4-(3-hydroxypropyl) cyclohexanol) (CP, Tocris Cookson, UK) was dissolved in DMSO (to 10 % of the final volume), suspended in Tween 80 (to 20 % of the final volume) and diluted in physiological saline (0.9 % NaCl). All injections were administered intraperitoneally at a volume of 1 ml/kg. The adolescent exposure experiment began at PND 29. During the 3-week treatment period, from PND 29 to PND 50, the animals received increasing doses of CP (0.15, 0.20 and 0.30 mg/kg for seven days at each dose), while the control group received similar exposure to the drug's vehicle (VEH). These gradually increasing doses of CP were employed to partially counter the development of drug tolerance (Gonzalez et al. 2005).

Experimental procedure

All the biochemical, neurohistological and electrophysiological studies were performed on adult animals (from PND 92) that have been tested in the object recognition and in the object location tasks as described previously (Renard et al, 2012). Only the adolescent CP-treated animals that were found deleterious at adulthood for these memory tasks were used for the following experiments.

Electrophysiology

The adolescent VEH-treated rats (n=9) and the adolescent CP-treated rats (n=10) were in adulthood (from PND 92), anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p., supplemented when necessary throughout the experiment) and placed in a stereotaxic frame. Body temperature was maintained at 37°C by a homeothermic warming blanket. The procedures for implantation and recording extracellular field potentials in the prelimbic area of the PFC are described elsewhere (Mailliet et al. 2008; Rocher et al. 2004). Recording electrodes (64 µm diameter, two nickel chrome wires) were positioned in the prelimbic cortex (coordinates: 3.3 mm anterior to bregma, 0.8 mm lateral to the midline) and a bipolar concentric stainless steel stimulating electrode (150 µm outer diameter with a 300 µm tip separation) was lowered into the ipsilateral CA1/subicular region of the ventral hippocampus (coordinates: 6.5 mm posterior to bregma, 0.5 mm lateral to the midline). Stimulation of the CA1/subicular region evokes a characteristic monosynaptic negative going field excitatory postsynaptic potential (fPSP) in the PFC with a peak latency of 18–22 ms. The final placement of the recording and stimulating electrodes were optimized using electrophysiological criteria (maximum amplitude of the field potential). Test pulses (100 ms) were delivered every 30 s at an intensity that evokes a response of 70 % of its maximum (range: 250–400 mA). At this intensity, the field potential is most likely to reflect summated fPSPs. High frequency stimulation (HFS) to induce LTP consisted of two series of 10 trains (250 Hz, 200 ms) at 0.1 Hz, 6 min apart, delivered at test intensity. PSP amplitudes were analysed using Advance software (Fine Science Instruments, Vancouver, Canada), expressed as a percentage change of the mean response over a 30 min baseline period and presented in figures as the mean ± SEM for 2 min epochs. Electrophysiological data were averaged in consecutive 30 min periods (*t*0–30 min; *t*30–60 min; *t*60–90 min; *t*90–120min) after LTP

induction and statistical comparisons were carried out using analysis of variance (ANOVA). Differences between groups were considered to be significant if $p < 0.05$.

Morphological analysis

We used a modified Golgi Cox method initially described by Gibb and Kolb (Gibb and Kolb 1998). Adult rats were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) and perfused intracardially with saline solution (NaCl 0.9 %). Whole adult brains were dissected out, separated in 2 hemispheres and each immersed in Golgi-Cox solution (10.4 g/l K₂Cr₂O₇, 10.4 g/l HgCl₂ and 8.33 g/l K₂Cr₂O₄ in distilled water) for five days or eight days, in the dark. Hemispheres were then immersed in a 30 % sucrose solution for ten days. Hemispheres were placed in a 6 % sucrose solution and cut on a vibratome (Leica VT 1000S) and 200 µm thick sections were collected on cleaned, gelatin-coated slides. Slides were dried with blotting paper and immersed in the following solutions: NH₄OH (30 min), H₂O (1 min), Rapid fixer Kodak (30 min), H₂O (1 min), ethanol 70 % (2 min), ethanol 95 % (2 min), ethanol absolute (10 min) and 1/3 xylene, 1/3 ethanol, 1/3 chloroform solution (15 min). Slides were cleared in xylene (15 min) and were cover-slipped with Depex.

Slices were observed with a microscope (Zeiss, Axio Imager M1) equipped with an AxioCam MRm CCD camera (Zeiss). Images were acquired using an X 20 objective, with the AxioVision 4.7 software (Zeiss), and stored as gray scale bitmaps. The pyramidal neurons from layer II/III of the medial PFC (mPFC, corresponding to Cg1, prelimbic and infralimbic cortex of Paxinos and Watson) were selected for the study (Paxinos and Watson 1998). The selected neurons had the following features (1) a clear localization of the cell body in the layer II/ III approximately between 250 and 350 µm from the pia and clear characteristics of pyramidal neurons, defined by the presence of a basilar dendritic tree and a single apical dendrite, (2) localization in the middle of the section in order to avoid analysis of the neuron whose processes extend largely into adjacent sections, (3) relative separation from neighboring neurons and blood vessel, which could obscure their morphology and (4) similar size of neuronal body. The morphological analysis was performed using Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD; <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>), and the Neuron Morpho plug-in for reconstruction and the LMeasure software to define the arbor length. To calculate the dendritic complexity index (DCI), we assigned each branch tip an order value

that equaled the number of branch points between the tip and the base of its primary dendrite. Thereby, the DCI was calculated according to the following formula:

$$\text{DCI} = (\sum \text{branch tip orders} + \# \text{ of branch tips}) / \# \text{ of primary dendrites) } \times \text{ total arbor length}$$

The morphology of apical and basal arbors was quantified. Neurons from 5 adult CP-treated rats during adolescence and 5 respective-VEH were analyzed and number of neurons under analysis totaled 49 (25 in the CP-treated group and 24 in the VEH-treated group).

Values for the DCI, number and length of dendrites (total, apical and basal) obtained from individual animal were averaged and calculated with one-way ANOVA. Values are expressed as mean \pm SEM and compared with control values. Differences between groups were considered to be significant if $p < 0.05$.

Western blotting

The adolescent VEH-treated rats (n=6) and the adolescent CP-treated rats (n=6) were decapitated at adulthood (PND 92). The brains were quickly removed. The cerebral areas (prefrontal cortex and hippocampus) were obtained within a few minutes by regional dissection on ice and immediately frozen and stored at -80°C until processing. For total protein lysate, each brain region was homogenized in an appropriate volume of ice-cold Buffer (10 mM Hepes pH 7.5, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM sodium orthovanadate, 50 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 0.5% Triton, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin) and centrifuged at 13,000 rpm at 4°C for 3 min. The supernatant was used as total protein lysate and protein concentrations were determined according to the Micro-BCA assay kit (Pierce, Rockford, IL). Equal amounts of protein from the lysate (10 μg for all blotting except for the VGLUT3 for which 20 μg was loaded), were separated by SDS-PAGE using a 10% running gel (CriterionTM Precast Gel, 10 % Tris-HCl, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and transferred to a 0.2 μm PVDF membrane (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The membranes were then incubated for 30 min at room temperature in blocking buffer (TBS-Tween 20 0.1 %, BSA 5 %, NaN_3 0.02 %). Immunoblotting was carried out overnight at 4°C with the primary antibody. Primary antibodies were: (I) polyclonal anti-synaptophysin (1:1000; AbCam); (II) monoclonal anti-PSD95 (1:2000; AbCam) (III) polyclonal anti-

VGLUT3 (1:500; Abcam). To control for protein loading, the membranes were incubated with a monoclonal antibody raised against α -actin (1:5000; Millipore-Chemicon) or β -tubulin (1:10000; Sigma) according to the molecular weight of the protein of interest. Membranes were washed and incubated with secondary HRP anti-rabbit or anti-mouse antibody for 1h at room temperature. At the end of the incubation, membranes were washed and the immunoreactive bands were detected by chemiluminescence (Super Signal™ ThermoScientific). The relevant immunoreactive bands were quantified with scanning densitometry using the GS-800 Imaging Densitometer (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and the density of each band was quantified using the Quantity One software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Expression of the proteins was normalized to that of α -actin (for VGLUT3) or β -tubulin (for PSD95 and synaptophysin) and the density of the bands was expressed as a percentage of the average of control. Biochemical data were compared between groups (VEH and CP) using Student's *t* test, are expressed as mean \pm SEM and are compared with control values. Differences between groups were considered to be significant when $p < 0.05$.

Results

Reduction in the expression of hippocampus-PFC LTP

The long-term effect of chronic CP exposure during adolescence on synaptic plasticity in the hippocampal-PFC pathway was examined from 42 days after cessation of the CP treatment. In the VEH-treated animals, HFS of the CA1/subiculum region induced a long lasting increase in the amplitude of the PSP in the ipsilateral PFC when compared to baseline (Fig. 1A). Chronic adolescence exposure to CP significantly and robustly impaired LTP in the adult PFC from 60 min after HFS to the end of the recording when compared to the adolescent VEH-treated rats (t_{60-90} min: 120.71 ± 7.12 % vs. 148.65 ± 6.7 %; $p < 0.05$ and t_{90-120} min: 110.14 ± 9.56 % vs. 146.71 ± 6.54 %; $p < 0.01$) (Fig. 1B).

Basal dendritic arborizations of pyramidal neurons in the PFC are significantly reduced

The morphology of layer II/III pyramidal neurons was analysed in the adult PFC, 42 days after cessation of the CP treatment. Chronic CP exposure during adolescence significantly decreased the total dendritic number of layer II/III pyramidal neurons in the adult PFC [F (1,

47) =47.987; $p < 0.0001$] (Fig. 2C). This alteration was accompanied by a reduction in the total dendritic length [F (1, 47)=34,828; $p < 0,0001$] (Fig. 2D). In order to assess where these modifications occur, we analysed the total length and the total number of both basal and apical dendrites. Reductions in the total dendritic length and the total dendritic number were only found for the basal [F (1, 47)=23,859 and 51,957 respectively, $p < 0,001$] but not the apical dendrites (Fig. 2C, 2D). In addition, chronic CP exposure during adolescence resulted at adulthood in a decrease in the complexity (quantified by DCI) of the basal dendrites [F (1, 47)= 43,370; $p < 0,001$] whereas the complexity of the apical dendrites remained unchanged (Fig. 2E).

PSD95 level in the PFC is significantly reduced

PSD95, Synaptophysin and VGLUT3 expression levels were studied 42 days after cessation of the CP treatment, in the adult PFC (Fig.3A) and in the adult hippocampus (Fig. 3B). A significant decrease in the levels of PSD95 was found in the adult PFC of the adolescent CP-treated rats compared to the adolescent VEH-treated rats ($t(10)=2.734$, $p < 0.05$) (Fig. 3A). We observed a slight, but not significant decrease in PSD95 in the adult hippocampus (Fig. 3B). In addition, chronic CP exposure during adolescence did not modify the levels of synaptophysin and VGLUT3 neither in the adult PFC (Fig. 3A) nor in the adult hippocampus (Fig. 3B).

Discussion

Chronic cannabinoid exposure induces long-term behavioral disturbances but little is known about the molecular, structural and functional underpinnings of these deficits. Here, we demonstrate, for the first time, that chronic exposure to cannabinoid agonists during adolescence produces an impairment in the expression of hippocampal-PFC synaptic plasticity that is associated with morphological alterations in basal dendritic arborizations of pyramidal neurons in layers II/III and a significant reduction in PSD95 in the PFC.

In animals, research on the long-term detrimental effects of chronic exposure to cannabinoid agonists during adolescence in the brain has primarily focused on the adult hippocampus. To the best of our knowledge, no animal study has investigated the impact of chronic adolescent exposure to cannabinoid agonists on the adult PFC function although PFC dysfunctions characterize many cognitive disorders that are central features of schizophrenia (Elvevag and Goldberg 2000).

Here, we report that chronic CP exposure during adolescence (PND 29 to PND 50) impairs synaptic plasticity, by reducing the expression of LTP in the hippocampal–PFC connection over time. Animals chronically treated with CP during adolescence are unable to maintain a long lasting LTP in the PFC. Very few studies have examined the impact of adolescence chronic cannabinoid exposure on the adult LTP. Chronic treatment with the CB1R agonist WIN55,212-2 during late adolescence (PND 40 to PND 65) impaired hippocampal to accumbens LTP 24h and 10 days after cessation of the cannabinoid treatment, but had no significant effect on LTP at perforant path-dentate gyrus synapses (Abush and Akirav 2012). In contrast, LTP at CA3-CA1 synapses in the hippocampus was not affected by chronic exposure to CP 55,940 during adolescence (Higuera-Matas et al. 2009). Therefore, brain regions and/or pathways may be differently sensitive to the effects of cannabinoid agonists with regards to the maturational stage of the endocannabinoid and related neurotransmission systems occurring during the cannabinoid exposure.

The hippocampus is connected with the PFC by axons originating in the subiculum and ventral CA1 subfields, which terminate in the medial PFC to establish glutamatergic contacts with both pyramidal cells and interneurons (Degenetais et al. 2003; Jay and Witter 1991; Jay et al. 1992, Tierney et al. 2004). CB1Rs in the PFC are presynaptic receptors primarily expressed in GABAergic interneurons and pyramidal neurons (Marsicano and Lutz 1999). These receptors have a modulatory role in the GABA and glutamate releases and therefore contribute to the control of excessive neuronal excitation or inhibition by acting through an intrinsic tone (Katona 2009; Marsicano et al. 2003). CB1Rs represent critical players in the maintenance and the determination of both short-term and long-term synaptic plasticity (Chevaleyre et al. 2006; Freund 2003). Furthermore, CB1Rs undergo remodeling during adolescence, primarily in the PFC, suggesting the implication of endocannabinoid signaling for the maturation and the modulation of prefrontal neurotransmission (Egerton et al. 2006). Furthermore, chronic cannabinoid treatment induces a down-regulation and desensitization of CB1Rs (Breivogel et al. 1999; Martin 2005), a phenomena that might dramatically affect the proper process of maturational refinement of cortical neuronal networks within the PFC during adolescence, leading to long-lasting modifications of synaptic activity in the PFC and in the hippocampal-to PFC network.

Interestingly, we showed that chronic CP exposure during adolescence induced profound atrophy and remodeling of the basal, but not the apical dendrites as well as the basal dendritic

complexity of the mPFC pyramidal neurons of layers II/III. The observed mPFC morphological changes may correlate closely with the synaptic plasticity impairments discussed above. Similar morphological modifications have been underlined in dentate granule neurons of adult hippocampus where adolescent THC-treated rats showed decreases in total dendritic number, length and spine density (Rubino et al. 2009). The dendritic structure is dynamically produced by synaptic activity and the size of the dendritic arbor is generally proportional to glutamatergic excitatory innervations (McAllister 2000). Changes in the morphology of the adult mPFC pyramidal neurons may result from long-term reduced glutamatergic neurotransmission due to activation of CB1Rs during the adolescent period. In addition, because most of the synapses are onto basal dendrites (Larkman 1991), the reduction and atrophy of the basal dendritic tree observed here could suggest a decrease in the surface required for the formation of synaptic contacts and reinforce the enduring impairment in synaptic plasticity. Alterations in cytoarchitectural features like atrophy of the basal dendrites of cortical pyramidal neurons, as well as a decreased density in dendritic spines and a reduction in volume of neuropil have been demonstrated in the PFC of schizophrenic patients (Broadbelt et al. 2002; Kalus et al. 2000; Wong and Van Tol 2003). Thus, the proper growth and arborization of the basal dendrites are crucial for the proper functioning of the PFC.

Furthermore, we investigated the levels of some presynaptic (VGLUT3, synaptophysin) and postsynaptic marker proteins (PSD95) and found a significant decrease in PSD95 in the adult PFC of adolescent CP-treated rats and a slight, but not significant decrease in their hippocampus. PSD95 is a scaffolding protein which most important role is to anchor and organize the NMDA receptor and other synaptic proteins in the postsynaptic density (Kim and Sheng 2004; Sheng and Pak 1999). PSD95 is involved in synaptic plasticity through its close interaction with NMDA receptor (Irie et al. 1997; Niethammer et al. 1996). Indeed, efficient NMDA receptor activity is required for the expression of PSD95 (Migaud et al. 1998; Sattler et al. 1999). We can speculate that the observed decrease in PSD95 in the adult PFC may reflect reduced glutamatergic signalings at postsynaptic sites of the NMDA receptors. Similarly, Rubino and colleagues have shown a decrease in PSD95 level in the adult hippocampus of adolescent THC-treated rats that was correlated to a significant reduction in hippocampal NMDA receptor level (Rubino et al. 2009). Surprisingly, they did not observe changes in the expression of PSD95 in the adult CPF. These divergent findings may reflect the different potencies of the agonists (CP55,940 being a full agonist while THC

acts as a partial agonist) and/or the period of the cannabinoid exposure (PND 35 to PND 45 vs. PND 29 to PND 50 in our study). In line with our data and hypothesis, recent studies have shown a lower expression of PSD95 in the PFC, but not in the hippocampus of schizophrenics and this decrease was associated with a lower expression of the NMDA receptor subunits (Ohnuma et al. 2000). Such glutamate dysregulation probably contribute to the altered plasticity and cognitive impairments observed in schizophrenia. At the presynaptic level, western blot analysis also showed that there were no changes in the expression of the third subtype of glutamate vesicular transporter (VGLUT3) and the expression of the synaptic vesicle associated protein, synaptophysin in the PFC and the hippocampus. These data will need further investigation in the expression of other synaptic marker proteins to support the hypothesis that chronic CP exposure during adolescence may affect synaptic transmission, structural and synaptic plasticity across the synaptic cleft mostly at the postsynaptic rather than the presynaptic level.

We have previously shown that chronic CP exposure during adolescence in rats (PND 29 to PND 50), but not during adulthood (PND 70 to PND 91), induced long-lasting impairments in short-term memory and spatial working memory measured in the object recognition and the object location tests, respectively (Renard et al. 2012). These cognitive deficits which are consistent with other studies demonstrating that adolescent rats chronically treated with CB1R agonists exhibited at adulthood severe memory impairments (O'Shea et al. 2006) may be associated to the altered PFC neuroplasticity.

In conclusion, the present study identifies the structural, biochemical and electrophysiological changes that underpin chronic adolescent cannabinoid exposure-induced impairments in the PFC function. The results reinforce the view that synaptic modifications, at both the structural and physiological levels, are critical in mediating chronic adolescent cannabinoid exposure effects in the brain. Importantly, our results highlight the fact that chronic adolescent cannabinoid exposure influences the integrity of the hippocampus-to-PFC pathway, thereby helping to improve our understanding on the substrates of the long-term cognitive deficits. We speculate that chronic adolescent cannabinoid exposure in rats may provide a model for future studies of the role of cannabinoids, as it may be related to psychosis vulnerability.

References

- Abush H, Akirav I (2012) Short- and long-term cognitive effects of chronic cannabinoids administration in late-adolescence rats. *PLoS One* 7: e31731
- Adriani W, Granstrem O, Macri S, Izykenova G, Dambinova S, Laviola G (2004) Behavioral and neurochemical vulnerability during adolescence in mice: studies with nicotine. *Neuropsychopharmacology* 29: 869-78
- Andersen SL (2003) Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev* 27: 3-18
- Arseneault L, Cannon M, Witton J, Murray RM (2004) Causal association between cannabis and psychosis: examination of the evidence. *Br J Psychiatry* 184: 110-7
- Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Vogt LJ, Sim-Selley LJ (1999) Chronic delta9-tetrahydrocannabinol treatment produces a time-dependent loss of cannabinoid receptors and cannabinoid receptor-activated G proteins in rat brain. *J Neurochem* 73: 2447-59
- Broadbelt K, Byne W, Jones LB (2002) Evidence for a decrease in basilar dendrites of pyramidal cells in schizophrenic medial prefrontal cortex. *Schizophr Res* 58: 75-81
- Degenetais E, Thierry AM, Glowinski J, Gioanni Y (2003) Synaptic influence of hippocampus on pyramidal cells of the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study. *Cereb Cortex* 13: 782-92
- Egerton A, Allison C, Brett RR, Pratt JA (2006) Cannabinoids and prefrontal cortical function: insights from preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev* 30: 680-95
- Elvevag B, Goldberg TE (2000) Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. *Crit Rev Neurobiol* 14: 1-21
- Freund TF (2003) Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci* 26: 489-95
- Gibb R, Kolb B (1998) A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J Neurosci Methods* 79: 1-4
- Giedd JN, Blumenthal J, Jeffries NO, Castellanos FX, Liu H, Zijdenbos A, Paus T, Evans AC, Rapoport JL (1999) Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nat Neurosci* 2: 861-3
- Harkany T, Keimpema E, Barabas K, Mulder J (2008) Endocannabinoid functions controlling neuronal specification during brain development. *Mol Cell Endocrinol* 286: S84-90
- Heng L, Beverley JA, Steiner H, Tseng KY (2010) Differential developmental trajectories for CB1 cannabinoid receptor expression in limbic/associative and sensorimotor cortical areas. *Synapse* 65: 278-86
- Higuera-Matas A, Botreau F, Miguens M, Del Olmo N, Borcel E, Perez-Alvarez L, Garcia-Lecumberri C, Ambrosio E (2009) Chronic periadolescent cannabinoid treatment enhances adult hippocampal PSA-NCAM expression in male Wistar rats but only has marginal effects on anxiety, learning and memory. *Pharmacol Biochem Behav* 93: 482-90
- Irie M, Hata Y, Takeuchi M, Ichtchenko K, Toyoda A, Hirao K, Takai Y, Rosahl TW, Sudhof TC (1997) Binding of neuroligins to PSD-95. *Science* 277: 1511-5
- Jay TM, Thierry AM, Wiklund L, Glowinski J (1992) Excitatory Amino Acid Pathway from the Hippocampus to the Prefrontal Cortex. Contribution of AMPA Receptors in Hippocampo-prefrontal Cortex Transmission. *Eur J Neurosci* 4: 1285-1295
- Jay TM, Witter MP (1991) Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 313: 574-86
- Kalus P, Muller TJ, Zuschratter W, Senitz D (2000) The dendritic architecture of prefrontal pyramidal neurons in schizophrenic patients. *Neuroreport* 11: 3621-5

- Katona I (2009) Endocannabinoid receptors: CNS localization of the CB(1) cannabinoid receptor. *Curr Top Behav Neurosci* 1: 65-86
- Kim E, Sheng M (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5: 771-81
- Kreitzer AC, Regehr WG (2001) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* 29: 717-27
- Larkman AU (1991) Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: III. Spine distributions. *J Comp Neurol* 306: 332-43
- Laviola G, Adriani W, Terranova ML, Gerra G (1999) Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 993-1010
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutierrez SO, van der Stelt M, Lopez-Rodriguez ML, Casanova E, Schutz G, Zieglerberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302: 84-8
- Marsicano G, Lutz B (1999) Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci* 11: 4213-25
- Martin BR (2005) Role of lipids and lipid signaling in the development of cannabinoid tolerance. *Life Sci* 77: 1543-58
- McAllister AK (2000) Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth. *Cereb Cortex* 10: 963-73
- Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, Webster LC, Watabe AM, Makhinson M, He Y, Ramsay MF, Morris RG, Morrison JH, O'Dell TJ, Grant SG (1998) Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 396: 433-9
- Niethammer M, Kim E, Sheng M (1996) Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci* 16: 2157-63
- Nuechterlein KH, Dawson ME (1984) A heuristic vulnerability/stress model of schizophrenic episodes. *Schizophr Bull* 10: 300-12
- O'Shea M, McGregor IS, Mallet PE (2006) Repeated cannabinoid exposure during perinatal, adolescent or early adult ages produces similar longlasting deficits in object recognition and reduced social interaction in rats. *J Psychopharmacol* 20: 611-21
- O'Shea M, Singh ME, McGregor IS, Mallet PE (2004) Chronic cannabinoid exposure produces lasting memory impairment and increased anxiety in adolescent but not adult rats. *J Psychopharmacol* 18: 502-8
- Ohnuma T, Kato H, Arai H, Faull RL, McKenna PJ, Emson PC (2000) Gene expression of PSD95 in prefrontal cortex and hippocampus in schizophrenia. *Neuroreport* 11: 3133-7
- Quinn HR, Matsumoto I, Callaghan PD, Long LE, Arnold JC, Gunasekaran N, Thompson MR, Dawson B, Mallet PE, Kashem MA, Matsuda-Matsumoto H, Iwazaki T, McGregor IS (2008) Adolescent rats find repeated Delta(9)-THC less aversive than adult rats but display greater residual cognitive deficits and changes in hippocampal protein expression following exposure. *Neuropsychopharmacology* 33: 1113-26
- Renard J, Krebs MO, Jay TM, Le Pen G (2012) Long-term cognitive impairments induced by chronic cannabinoid exposure during adolescence in rats: a strain comparison. *Psychopharmacology (Berl)*
- Rubino T, Realini N, Braida D, Guidi S, Capurro V, Vigano D, Guidali C, Pinter M, Sala M, Bartesaghi R, Parolaro D (2009) Changes in hippocampal morphology and neuroplasticity induced by adolescent THC treatment are associated with cognitive impairment in adulthood. *Hippocampus* 19: 763-72
- SAMHSA (2010) Substance abuse and Mental Health Service Administration. Results from the 2010 National Survey on Drug Use and Health. National Findings, Office of Applied Studies

- Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M (1999) Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science* 284: 1845-8
- Schneider M, Koch M (2003) Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid treatment impairs sensorimotor gating, recognition memory, and the performance in a progressive ratio task in adult rats. *Neuropsychopharmacology* 28: 1760-9
- Schneider M, Koch M (2007) The effect of chronic peripubertal cannabinoid treatment on deficient object recognition memory in rats after neonatal mPFC lesion. *Eur Neuropsychopharmacol* 17: 180-6
- Schneider M, Schomig E, Leweke FM (2008) Acute and chronic cannabinoid treatment differentially affects recognition memory and social behavior in pubertal and adult rats. *Addict Biol* 13: 345-57
- Semple DM, McIntosh AM, Lawrie SM (2005) Cannabis as a risk factor for psychosis: systematic review. *J Psychopharmacol* 19: 187-94
- Sheng M, Pak DT (1999) Glutamate receptor anchoring proteins and the molecular organization of excitatory synapses. *Ann N Y Acad Sci* 868: 483-93
- Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 417-63
- Tierney PL, Degenetais E, Thierry AM, Glowinski J, Gioanni Y (2004) Influence of the hippocampus on interneurons of the rat prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 20: 514-24
- Wong AH, Van Tol HH (2003) Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 269-306

Quatrième partie

Discussion générale

La consommation chronique de cannabis pendant l'adolescence représente un facteur de risque qui peut conduire à l'émergence de la schizophrénie à l'âge adulte (Andreasson et al. 1987). Le plus grand risque que comporte un usage précoce du cannabis, déjà souligné par plusieurs travaux est à prendre en considération (Arseneault et al. 2004; Stefanis et al. 2004). Pour anticiper ces phénomènes et gérer les risques associés à la consommation de cannabis durant l'adolescence, nous devons identifier les mécanismes mis en jeu lors d'une consommation abusive et précoce de cannabis et les facteurs biologiques directement responsables d'une prédisposition à la maladie. Pour évaluer ces hypothèses, l'utilisation de modèles animaux semble être l'approche la plus appropriée.

L'objectif principal de ces travaux de thèse a été de mettre au point un modèle d'exposition au cannabis en période d'adolescence chez le Rat afin de rechercher, chez ces animaux à l'âge adulte, d'éventuelles anomalies comportementales apparentées aux maladies psychiatriques, notamment à la schizophrénie. Nous avons tout d'abord montré que chez le Rat, l'exposition à l'agoniste RCB1 CP55, 940 (CP) durant l'adolescence (JPN 29 à JPN 50) entraîne à l'âge adulte, des déficits significatifs et durables de la mémoire à court terme (dans le test de la reconnaissance d'objets) et de la mémoire de travail spatiale (dans le test de la reconnaissance spatiale). Le même traitement administré à l'âge adulte (JPN 70 à JPN 91) n'entraîne pas de déficits cognitifs à long terme. Ces résultats démontrent que l'adolescence est une période critique et vulnérable aux effets délétères des cannabinoïdes sur les processus mnésiques. Cependant, les mécanismes mis en jeu par l'activation des RCB1 par les cannabinoïdes exogènes durant l'adolescence sur le développement de troubles cognitifs à l'âge adulte sont encore mal connus. Ainsi, l'apport de nos travaux et leur originalité a été de corréler les déficits cognitifs, mis en évidence après une exposition aux cannabinoïdes durant l'adolescence chez le Rat, à des modifications fonctionnelles et structurales du CPF et des altérations de la plasticité des synapses hippocampo-préfrontales. L'hippocampe, le CPF, de même que l'interaction entre ces deux régions jouent un rôle primordial dans des fonctions cognitives complexes que l'on sait être altérées dans certaines pathologies psychiatriques et dans l'étiologie de la schizophrénie.

Dans cette discussion, nous verrons comment, dans un premier temps, nous avons élaboré la mise au point du modèle animal d'exposition aux cannabinoïdes exogènes durant l'adolescence chez le Rat. Puis nous analyserons, les déficits à long terme mis en évidence sur le plan comportemental, structural et fonctionnel dans ce modèle animal.

A. Mise au point du modèle animal

Les données concernant les effets à long terme d'une exposition aux cannabinoïdes durant l'adolescence chez le Rat sont parfois controversées et semblent dépendre de la période de traitement, du choix de l'agoniste RCB1 et des doses utilisées. La souche de rats pourrait aussi être un critère important pour la mise au point de ce modèle animal.

1. Définition de la fenêtre de vulnérabilité de l'adolescence chez le Rat

La difficulté initiale dans la mise au point du modèle, a été de cibler la période de vulnérabilité la plus pertinente pour injecter l'agoniste cannabinoïde. Nous nous sommes inspirés des travaux de Schneider et Koch démontrant que chez le Rat, l'exposition chronique à un agoniste des RCB1 (WIN55,212-2; 1,2mg/kg) du 40^{ème} au 65^{ème} JPN engendrait à l'âge adulte des anomalies du filtrage de l'information sensorimotrice, des comportements sociaux anormaux ainsi que des perturbations des processus cognitifs (Schneider and Koch 2003). Ces anomalies comportementales s'apparentant aux symptômes observés chez les patients schizophrènes, notre objectif a donc été d'utiliser ce modèle animal pour étudier plus précisément les effets comportementaux à long terme liés à une exposition aux cannabinoïdes durant l'adolescence. Dans un premier temps, le travail a été réalisé sur des rats de souche Wistar, injectés avec du WIN55, 212-2 (1,2 mg/kg) et du CP55, 940 (0,3 mg/kg) depuis le 40^{ème} JPN jusqu'au 65^{ème} JPN (selon le protocole d'injection de Schneider et Koch en 2003, à savoir 20 injections délivrées de façon irrégulière durant les 25 jours de traitement). Nous avons ensuite évalué les conséquences à long terme des cannabinoïdes sur (1) la mémoire à court terme (test de la reconnaissance d'objets), (2) la mémoire de travail spatiale (test de localisation d'objets), (3) le filtrage des informations sensorielles (test PPI), (4) la coordination motrice (test rotarod) et (5) l'interaction sociale (test d'interaction sociale). Ne réussissant pas à répliquer les déficits comportementaux mis en évidence par Schneider et Koch, nous avons remis en question la souche de rats utilisée, le choix et la concentration de l'agoniste, mais surtout, la période durant laquelle le traitement était administré. En effet, l'adolescence chez le Rat est une période qui suscite de nombreux débats. Elle commencerait environ 7 jours avant la puberté pour se terminer quelques jours après. Spear la définit comme étant la période qui s'étend du 28^{ème} au 42^{ème} JPN (Spear 2000). Pour Ojeda, elle s'étendrait, chez le rat mâle, du 35^{ème} au 60^{ème} JPN et chez le rat femelle du 28^{ème} au 40^{ème} JPN (Ojeda et al. 2003). De plus, des travaux de l'équipe d'O'Shea démontrent qu'un traitement du 30^{ème} au 50^{ème} JPN avec des doses croissantes de CP55, 940 induit des perturbations de la mémoire de travail et de l'interaction sociale chez le Rat à l'âge adulte (O'Shea et al. 2006; O'Shea et al. 2004). Sur la base de l'ensemble de ces données, nous avons choisi de modifier la fenêtre d'injection des agonistes cannabinoïdes en injectant l'agoniste RCB1 du 29^{ème} au 50^{ème} JPN. C'est en ciblant cette nouvelle période pour l'exposition aux cannabinoïdes dans notre modèle expérimental, que nous avons mis en évidence les dysfonctionnements cognitifs à l'âge adulte.

2. Choix de l'agoniste et des doses

Nous avons utilisé le CP55, 94O (CP) car il possède une haute affinité pour les RCB1 et est donc plus spécifique ($0,5 \text{ nM} < K_i < 5 \text{ nM}$) comparé au WIN55, 212-2 ($1,89 \text{ nM} < K_i < 123 \text{ nM}$) et au THC ($5,05 \text{ nM} < K_i < 80,3 \text{ nM}$).

Chez l'Homme, lors d'une consommation chronique au cannabis, on note une diminution progressive des effets d'ébriété recherchés. Ceci pousse le consommateur à augmenter les doses et la fréquence des usages : on parle alors de tolérance. Chez l'animal, un phénomène de tolérance aux cannabinoïdes existe aussi (Costa et al. 1996; Perez et al. 2009). Il est lié à une diminution du nombre et/ou de l'efficacité des RCB1 dans le système limbique du fait de l'activation chronique de ces derniers (Oviedo et al. 1993; Rodriguez de Fonseca et al. 1993). Si les récepteurs sont moins actifs, les effets ressentis de la drogue sont moindres et il faut augmenter les doses pour ressentir les effets recherchés. Ainsi, pour éviter le phénomène de tolérance aux effets des cannabinoïdes, nous avons utilisé des doses croissantes d'agonistes (0,15 ; 0,20 et 0,30 mg/kg) réparties sur toute la période de traitement. Ces doses croissantes ont été choisies sur la base d'expériences menées au préalable dans l'équipe. En effet, plusieurs gammes de doses croissantes de CP ont été testées (0,15 ; 0,20 ; 0,30 mg/kg ; 0,3 ; 0,4 ; 0,6 mg/kg et 0,6 ; 0,8 ; 1,2 mg/kg) et la gamme la plus efficace pour induire les effets délétères à long terme s'est révélée être la plus faible (0,15 ; 0,20 et 0,30 mg/kg). Ces doses de CP ont donc été choisies et espacées de 7 jours.

3. Choix de la souche de rats

La souche de rats à utiliser est un critère à prendre en compte pour la mise au point d'un modèle animal. Le traitement chronique aux cannabinoïdes pourrait entraîner des effets différents selon le fond génétique des rats utilisés. Des études d'auto-stimulation intracrânienne de cannabinoïdes effectuées chez des rats ainsi que des études de préférence de place indiquent en effet, que certaines souches de rats présentent des réponses motivationnelles différentes aux cannabinoïdes. Ainsi, les rats de la souche Lister Hooded présenteraient une plus grande capacité à s'auto-administrer des cannabinoïdes que les rats de la souche Wistar (Deiana et al. 2007) chez qui les agonistes RCB1 induisent une aversion de place (Chaperon et al. 1998; McGregor et al. 1996; Pandolfo et al. 2009) ainsi qu'une aversion pour la saccharine lorsqu'ils y sont associés (McGregor et al. 1996). Ces données suggèrent une valence hédonique plus élevée pour les cannabinoïdes chez les rats de la souche Lister Hooded comparativement aux rats de la souche Wistar. Nous avons comparé les effets à long terme d'une exposition aux cannabinoïdes durant l'adolescence sur ces 2 souches de rats. Les déficits que nous avons mis en évidence chez ces 2 souches de rats testées à l'âge adulte étaient comparables (Article 1) et nous avons choisi de travailler sur la souche de rats Wistar pour la suite de nos études (Article 2) (moins coûteux, plus dociles et plus faciles à manipuler que les rats Lister Hooded).

B. L'Adolescence est-elle une période de vulnérabilité pour les effets des cannabinoïdes ?

1. Mise en évidence de déficits cognitifs à long terme

Les troubles de la sphère cognitive des patients schizophrènes comprennent des déficits des fonctions exécutives, des déficits mnésiques incluant principalement la mémoire épisodique, la mémoire de travail visuo-spatiale, la mémoire à court terme et la mémoire de travail, ainsi que des déficits attentionnels et des troubles du langage (Gold et al. 2000; Hofer et al. 2003; Tracy et al. 2001). Les troubles cognitifs précèdent généralement l'éclosion de la maladie et s'accroissent avec l'évolution de celle-ci. Ces troubles sont invalidants et influencent nettement la qualité de vie du patient (Elvevag and Goldberg 2000; Green et al. 2004). Aujourd'hui, malgré les avancées thérapeutiques, il reste encore très difficile de traiter ces troubles cognitifs d'où l'intérêt de concentrer les recherches sur cette dimension.

Il est possible d'évaluer ces types de mémoire chez les rats dans des tâches comportementales simples. Le test de la reconnaissance d'objets et le test de la localisation d'objets chez le rongeur font partie des tests simples utilisés pour mesurer respectivement la mémoire de travail (à court terme) et la mémoire de travail spatiale des animaux. La différence entre ces deux tests est l'intégration d'une information spatiale dans le test de la localisation d'objets par rapport à celui de la reconnaissance d'objets. Ces tests comportent une phase d'acquisition T1, une phase de rétention et une phase de test T2 (phase de rappel). Au cours de la phase T1, l'animal encode et met en mémoire des informations spécifiques concernant les objets (dans le test de la reconnaissance d'objets) ou leur localisation (dans le test de la localisation d'objets). Puis, après un certain délai défini (délai de rétention), l'animal ayant gardé en mémoire les informations encodées pendant la phase T1 devra être capable d'utiliser ces informations visuelles pour discriminer, en phase de test T2, l'objet nouveau de l'objet familier (reconnaissance d'objets) ou la localisation nouvelle de la localisation familière (localisation d'objets). Dans notre étude, nous avons utilisé des délais de rétention (30 min et 120 min) pour évaluer ces différentes mémoires.

Nous avons montré qu'une exposition aux cannabinoïdes pendant l'adolescence (JPN 29 à 50) entraîne chez les rats adultes des effets délétères persistants de la mémoire à court terme et de la mémoire de travail spatiale, mesurées respectivement dans les tests de la reconnaissance d'objets et de la localisation d'objets. Ces perturbations se retrouvent de la même façon dans les 2 tâches, que la nature de l'information soit spatiale ou non spatiale. Le même traitement administré chez les adultes (JPN 70 à JPN 91) n'entraîne aucun effet mnésique néfaste à long terme. Ainsi, ces observations démontrent bien que l'adolescence est une période de vulnérabilité pour les effets délétères des cannabinoïdes sur les fonctions mnésiques. Chez le rongeur, ces tâches de reconnaissance mettent en jeu des circuits cérébraux distribués entre l'hippocampe, les structures parahippocampiques, les régions corticales et les régions sous-corticales (Bussey et al. 2000a; Ennaceur et al. 1997; Warburton et al. 2000) avec le rôle exécutif essentiel du CPF pour sa capacité à utiliser l'information encodée. Ainsi, les déficits cognitifs à long terme causés par le traitement chronique avec le CP durant l'adolescence pourraient être la conséquence d'une distorsion de la maturation et/ou de la connectivité de ces régions cérébrales impliquées dans les tâches cognitives choisies.

Toutefois, nous avons constaté que dans notre « population générale » de rats, les conséquences des effets à long terme sur le plan comportemental pouvaient être variables. Nous avons observé des rats fortement déficitaires, que nous avons qualifié de « high-responders », c'est-à-dire qu'ils répondaient fortement aux effets néfastes du CP, et des rats moins déficitaires que nous avons qualifié de « low-responders », répondant moins bien aux effets néfastes de la drogue. Malgré un même fond génétique, certains rats se montrent donc plus sensibles aux effets du CP. Dans la suite de notre étude et pour tenter de comprendre les mécanismes sous-jacents à ces déficits cognitifs, nous n'avons utilisé que les rats « high responders » aux effets délétères du CP.

2. Déficits dans l'expression de la PLT hippocampe-CPF à l'âge adulte

Nous avons évalué les effets à long terme du traitement avec l'agoniste RCB1 sur l'expression de la plasticité des synapses hippocampo-préfrontales chez les rats adultes. Des anomalies de la plasticité mettant en jeu des réseaux neuronaux distribués dans le CPF et l'hippocampe pourraient être à la base des troubles cognitifs de la schizophrénie (Eisenberg and Berman 2009). Par ailleurs, le stress, qui est un facteur contribuant au développement des maladies sensibles à celui-ci dont la schizophrénie, provoque des anomalies de la plasticité synaptique au niveau du circuit reliant l'hippocampe au CPF, des déficits cognitifs directement reliés à ce réseau et des modifications structurales dans le CPF (Cerqueira et al. 2007; Jay et al. 2004; Rocher et al. 2004). Le CPF entretient d'étroites connexions plus particulièrement avec l'hippocampe et l'on connaît la contribution majeure de chacune de ces deux régions dans les fonctions cognitives (Frankland and Bontempi 2005; Jay and Witter 1991; Laroche et al. 2000). On peut induire une PLT ou augmentation de l'efficacité synaptique dans le CPF par des patterns de stimulation spécifiques appliqués dans la région ventrale de l'hippocampe (région CA1/subiculum). Cette PLT, qui se traduit par une augmentation immédiate et durable (plusieurs heures) de l'amplitude de la réponse corticale est dépendante des récepteurs NMDA du glutamate (Jay et al. 1995; 1996). L'originalité de nos travaux a été de mettre en évidence des modifications à long terme de la fonctionnalité des synapses du réseau hippocampe-CPF en montrant un déficit dans le maintien de l'expression de la PLT chez les animaux adultes ayant été traités avec le CP durant leur adolescence. Ces effets délétères des cannabinoïdes sur la plasticité des circuits hippocampaux-CPF grâce auxquels le stockage et le transfert des informations mnésiques s'effectuent, renforcent l'idée que l'adolescence est une période critique et vulnérable aux effets délétères des cannabinoïdes sur les processus cognitifs.

Très peu d'études ont évalué l'impact d'une exposition aux cannabinoïdes durant l'adolescence chez le Rat sur l'expression de la PLT à l'âge adulte. Il a cependant été montré qu'un traitement chronique avec le WIN 55,212-2 à la fin de l'adolescence (JPN 40 à JPN 65) altérait la PLT du circuit hippocampe-accumbens 24h et 10 jours après la fin du traitement mais que ce même traitement n'induisait pas d'effet délétère sur la PLT enregistrée dans la voie perforante du gyrus denté (Abush and Akirav 2012). De même, un traitement chronique au CP pendant le début de l'adolescence (JPN 28 à JPN 38) n'a pas induit d'effet délétère sur la PLT des collatérales de Schäffer (Higuera-Matas et al. 2009). L'ensemble de ces données suggèrent que certaines régions cérébrales et/ou circuits neuronaux seraient plus sensibles aux effets des cannabinoïdes exogènes durant l'adolescence, ceci étant probablement en

lien avec les processus de maturation spécifiques de chacune de ces régions ou circuits se déroulant durant la période de traitement.

Le déficit dans l'expression de la PLT mis en évidence dans nos travaux pourrait être lié à des modifications dans la fonction ou l'expression des récepteurs NMDA du glutamate, provoquées par le traitement au CP pendant l'adolescence. Il pourrait aussi être dû à des modifications de la phosphorylation du facteur de transcription CREB, qui intervient dans le maintien de la PLT (Hotte et al. 2007). En effet, la stimulation des récepteurs NMDA provoque l'activation de la PKA qui est nécessaire à la phosphorylation de CREB, ce qui permet la synthèse de nouvelles protéines renforçant l'efficacité et la force synaptique (Carlezon et al. 2005). Des études récentes ont en effet démontré qu'un traitement chronique avec du THC chez le Rat induisait une diminution du niveau d'expression de CREB et de sa phosphorylation dans l'hippocampe, ainsi que des diminutions de l'expression des sous-unités NR2A et NR2B des récepteurs NMDA (Fan et al. 2010). Plus intéressant, Rubino et ses collaborateurs ont montré qu'un traitement chronique avec des doses croissantes de THC pendant l'adolescence chez le Rat (JPN 35 à JPN 45) provoque également à l'âge adulte une réduction durable des niveaux d'expression de CREB dans l'hippocampe (Rubino et al. 2008). D'autres études plus précises des mécanismes inhérents à cette difficulté de maintien de la PLT préfrontale suite à un traitement chronique aux cannabinoïdes durant l'adolescence chez le Rat sont à explorer.

3. Modifications de la morphologie des neurones de la couche II/III du CPF

La schizophrénie s'accompagne d'une diminution du volume du CPF et de l'hippocampe qui semblerait être liée à des modifications de la cytoarchitecture neuronale. Celles-ci regroupent la diminution de la taille des neurones pyramidaux (en rapport avec une diminution du volume dendritique et axonal) et la réduction du nombre et du volume des cellules gliales (Callicott et al. 2003). Ces modifications morphologiques pourraient être liées à la diminution de la fonctionnalité des connexions synaptiques décrites dans ces structures (McGlashan and Hoffman 2000). Ces anomalies cytoarchitecturales renforcent l'hypothèse neurodéveloppementale de la schizophrénie et l'idée de troubles de la connectivité neuronale au sein de l'hippocampe et du CPF qui pourraient être dus à des perturbations survenues lors des processus neurodéveloppementaux.

Nous montrons dans notre étude, pour la première fois, que l'exposition chronique avec le CP durant l'adolescence chez le Rat provoque une réduction durable du nombre et de la longueur des dendrites des neurones pyramidaux de la couche II/III du CPF des rats adultes. Ces modifications sont dues principalement à un remodelage des dendrites basales et ne sont pas retrouvées pour les dendrites apicales. Etant donné qu'une grande partie des synapses s'élabore au niveau des dendrites basales (Larkman 1991), ces modifications suggèrent une diminution de la surface requise pour l'élaboration de synapses et donc une perturbation de la connectivité neuronale au sein du CPF. Ceci pourrait être relié aux déficits de la plasticité synaptique enregistrée dans le CPF et aux déficits cognitifs mis en évidence à long terme. En effet, il a été montré que les neurones pyramidaux de la couche II/III du CPF étaient activés dans les processus cognitifs, notamment dans des tâches de mémoire de travail (Friedman and Goldman-Rakic 1994). Il semble donc évident que cette modification de la morphologie des neurones de la couche II/III du CPF observée dans notre étude

entraîne des répercussions sur le fonctionnement normal du CPF, notamment dans l'élaboration des processus cognitifs.

Par ailleurs, il a été montré que les neurones de la couche II/III du CPF reçoivent au niveau de leurs dendrites basales des afférences excitatrices provenant de neurones du noyau thalamique antérieur (Shibata 1993). Sachant que cette voie thalamo-corticale est engagée dans la boucle régulatrice servant à « filtrer » les informations sensorielles destinées au cortex (Carlsson et al. 1997) et qu'un dysfonctionnement du traitement des informations sensorielles est décrit chez les schizophrènes (Braff et al. 2001a), nous pouvons penser que la réduction des dendrites basales des neurones de la couche II/III du CPF pourrait aussi contribuer à l'émergence des troubles psychotiques. La qualité du filtre sensori-moteur (test PPI) mesurée chez les animaux sélectionnés pour l'analyse morphologique nous aurait permis d'étayer cette hypothèse.

La structure et l'arborisation dendritique sont reliées à l'activité synaptique et dépendent beaucoup des innervations excitatrices glutamatergiques : le nombre des afférences excitatrices pourrait déterminer la taille et la complexité dendritique.

On connaît également le rôle du système glutamatergique dans l'établissement et la stabilité des connexions synaptiques au cours du développement (Konradi and Heckers 2003). Un dérèglement du système glutamatergique dû à la sur-activation du RCB1 par le CP pendant l'adolescence, période intense de remaniement neuronal pourrait aussi être mis en cause.

La modulation du système endocannabinoïde est aussi contrôlée par les neurotrophines et plus particulièrement le BDNF et ces interactions, présentes lors du développement cérébral et à l'âge adulte, influencent et régulent la force synaptique (Maison et al. 2009). Il a été démontré qu'un traitement chronique avec du THC pendant l'adolescence chez le Rat (JPN 28 à JPN 42) tend à réduire durablement le BDNF mesuré au 80^{ème} JPN dans l'hippocampe des rats adultes (Viveros et al. 2005). Bien que les mécanismes précis de ces interactions restent encore à être élucidés, la participation du BDNF dans l'atrophie de l'arborisation neuronale que nous retrouvons dans les neurones pyramidaux du CPF reste à considérer.

4. Diminution de l'expression de PSD95 dans le CPF

De nombreuses modifications macroscopiques ont été observées dans la schizophrénie. L'augmentation de la densité neuronale liée à l'absence de pertes cellulaires plaide pour une réduction du neuropile. En d'autres termes, il y aurait une réduction de la connectivité neuronale. Cette hypothèse est renforcée par la diminution des marqueurs synaptiques. On retrouve des diminutions de PSD95, de synaptophysine et de syntaxine ainsi que des augmentations de la protéine GAP-43 (Growth Associated Protein 43) dans le CPF (Honer et al. 1997; Karson et al. 1999; Perrone-Bizzozero et al. 1996). Des diminutions de synapsine et de synaptophysine sont aussi observées dans l'hippocampe (Gabriel et al. 1997; Webster et al. 2001). Ces dysrégulations pourraient être liées aux déficits cognitifs et/ou aux altérations de la plasticité neuronale.

Se basant sur ces observations, notre objectif était de tester si le traitement au CP durant l'adolescence chez le Rat pouvait modifier certains de ces marqueurs dans l'hippocampe et le CPF à l'âge adulte. Le résultat majeur que nous avons obtenu est une diminution significative et durable du marqueur postsynaptique PSD95 dans le CPF, ainsi qu'une légère diminution (non significative) de son expression dans l'hippocampe. PSD95 est une molécule

d'échafaudage localisée au niveau des densités postsynaptiques des neurones et impliquée dans l'ancrage et la stabilisation des protéines synaptiques à la membrane du neurone postsynaptique (Craven and Bredt 1998; McGee and Bredt 2003). Cette fonction confère donc un rôle fondamental à PSD95 dans la plasticité synaptique, notamment dans la régulation des fonctions des récepteurs postsynaptiques au glutamate de type AMPA et NMDA (Irie et al. 1997; Niethammer et al. 1996). Ainsi, la diminution de l'expression de PSD95 dans le CPF que nous observons pourrait refléter une altération de l'expression des récepteurs au glutamate et donc de la transmission glutamatergique suite au traitement avec le CP durant l'adolescence. Cette diminution de PSD95 pourrait également expliquer la difficulté de maintien de la PLT mise en évidence chez ces animaux traités au CP. Rubino et ses collaborateurs ont également montré une diminution de PSD95 dans l'hippocampe de rats adultes qui avaient été traités pendant l'adolescence au THC qu'ils ont corrélé à une réduction significative du niveau d'expression des récepteurs NMDA (Rubino et al. 2009). De façon surprenante, ils n'ont pas trouvé de modifications d'expression de PSD95 dans le CPF. Par contre, des modifications de ce marqueur sont observées dans le CPF des femelles à l'âge adulte. Ces résultats contradictoires montrent la difficulté de reproductibilité du modèle et les variables dont peuvent dépendre les résultats : les conditions d'expérimentation, le nombre d'animaux par groupe, le choix de l'agoniste (le THC possède moins d'affinité pour le RCB1 que le CP55, 940), la période choisie pour l'administration des composés cannabinoïdes dépendant des phénomènes de maturation qui prennent place durant celle-ci.

Au niveau présynaptique, nous avons mesuré le niveau d'expression du transporteur au glutamate de type 3 (VGLUT3) et de la synaptophysine. De part ses propriétés, VGLUT3 concentre le glutamate dans les vésicules présynaptiques avant le relargage de celles-ci par exocytose. Son expression confère aux neurones l'habilité de libérer le glutamate (Santos et al. 2009). Quant à la synaptophysine, qui est la protéine membranaire la plus exprimée sur les vésicules synaptiques, elle est impliquée dans la régulation de l'assemblage SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) constitué de l'association de 3 protéines présynaptiques, SNAP-25 (Synaptosomal-Associated Protein 25), syntaxine et VAMP (Vesicle-Associated Membrane Proteins), permettant l'arrimage des vésicules à la membrane plasmique présynaptique et la fusion des membranes avec l'ouverture des pores de fusion, essentielle à la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique par exocytose. De cette façon, la synaptophysine module l'efficacité du cycle des vésicules synaptiques (Valtorta et al. 2004). Nous n'avons pas mis en évidence dans notre étude de modifications dans les niveaux d'expression de VGLUT3 ni de la synaptophysine dans le CPF et l'hippocampe des rats adultes ayant été traités durant l'adolescence avec le CP. Il serait délicat de penser à une neurotransmission « normale », d'autres marqueurs présynaptiques, tels que ceux qui constituent le complexe SNARE, doivent être testés avant d'émettre une telle conclusion. Néanmoins, le traitement chronique au CP durant l'adolescence semble induire plus de modifications au niveau postsynaptique que présynaptique.

C. Conclusion : Un modèle animal pour l'étude de la schizophrénie ?

Ces données montrent que l'exposition aux cannabinoïdes pendant l'adolescence chez le Rat entraîne des perturbations développementales au sein du CPF, engendrant des conséquences majeures sur le plan cognitif, sur la plasticité synaptique et l'établissement des connexions synaptiques à l'âge adulte, au regard des modifications durables de la mémoire de travail, de la PLT, de la morphologie cellulaire et de l'expression de certains marqueurs synaptique dans le CPF. Ces perturbations, de nature à modifier l'organisation des réseaux neuronaux, pourraient conduire à l'émergence des symptômes cognitifs de la schizophrénie à l'âge adulte. Ainsi, nous avons montré que les rats exposés au CP durant l'adolescence (JPN 29 à 50) présentent un phénotype comportemental et neurochimique comparable à celui décrit chez les patients schizophrènes. On peut supposer que ce modèle animal présente de bons critères de représentation (le modèle est capable d'induire certains symptômes de la pathologie) et de construction (similarité de l'étiologie et des mécanismes neurobiologiques sous-jacents) pour l'étude des symptômes cognitifs apparentés à ceux de la schizophrénie. La mise au point de ce modèle animal est essentielle pour l'étude des conséquences à long terme d'une consommation chronique de cannabis durant l'adolescence. Elle contribuera à améliorer notre compréhension des mécanismes de l'émergence des troubles cognitifs apparentés à ceux de la schizophrénie.

D. Hypothèse des mécanismes sous-jacents aux effets délétères d'une exposition aux cannabinoïdes exogènes sur les processus cognitifs

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'adolescence est caractérisée comme étant une période d'intenses remaniements fonctionnels et structuraux qui ont notamment lieu dans le CPF, permettant une maturation neuronale générale de la connectivité et des processus d'intégration, dans le but de mettre en place les fonctions inhérentes aux processus cognitifs. Pendant cette période, le remodelage des circuits inhibiteurs GABAergiques est crucial pour contrôler la neurotransmission glutamatergique qui doit être nécessaire et suffisante pour contribuer au bon déroulement de la maturation du CPF (Constantinidis et al. 2002; Cruz et al. 2003). La place stratégique des RCB1 sur les interneurons GABAergiques leur confère ce rôle de modulateur de l'excitabilité neuronale par le contrôle qu'ils exercent sur l'équilibre dynamique entre entrées excitatrices et inhibitrices sur le neurone pyramidal (balance glutamate/ GABA). L'interférence, pendant l'adolescence, entre les cannabinoïdes exogènes et l'action des endoCB sur les RCB1, affecterait de façon drastique la régulation de la balance homéostatique excitatrice/inhibitrice ainsi que les processus de maturation et d'affinement des réseaux neuronaux au sein du CPF. L'hypothèse avancée est que pendant l'adolescence, l'activation excessive des RCB1 par les cannabinoïdes exogènes présents en abondance sur les neurones GABA (par rapport aux neurones glutamatergiques) (Hill et al. 2007; Marsicano and Lutz 1999), entraînerait une diminution du tonus GABAergique, ce qui causerait par une levée de l'inhibition, la perte de leur contrôle sur le neurone glutamatergique et par conséquent, la sur-activation de celui-ci. La libération excessive de glutamate provoquerait un effet neurotoxique et une diminution de la fonction et/ou de l'expression des récepteurs NMDA, par un système de compensation (down-régulation), l'ensemble conduisant à une dysrégulation de la balance homéostatique

excitatrice/inhibitrice et de la connectivité neuronale au sein du CPF (Figure 1). En accord avec cette hypothèse, plusieurs études soulignent le rôle central de la dysrégulation de la balance GABA/glutamate (Benes and Berretta 2001; Lisman et al. 2008), notamment dans le CPF, sur l'émergence des déficits mnésiques des patients schizophrènes (Lewis et al. 2005).

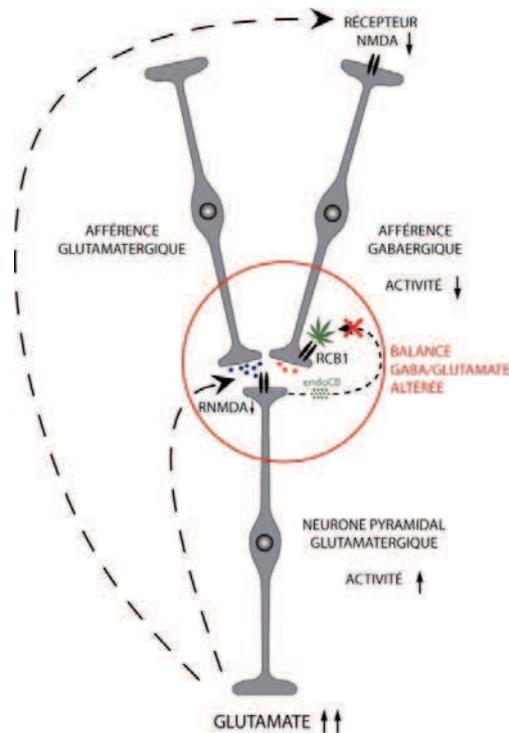


Figure 1 : Hypothèse schématique de la dysrégulation, par l'apport de cannabinoïdes durant l'adolescence, de la balance GABA/Glutamate lors de la maturation du CPF.

La figure 2 propose un modèle qui relie entre eux les mécanismes sous-jacents aux effets délétères des cannabinoïdes exogènes pendant l'adolescence, sur les processus cognitifs.

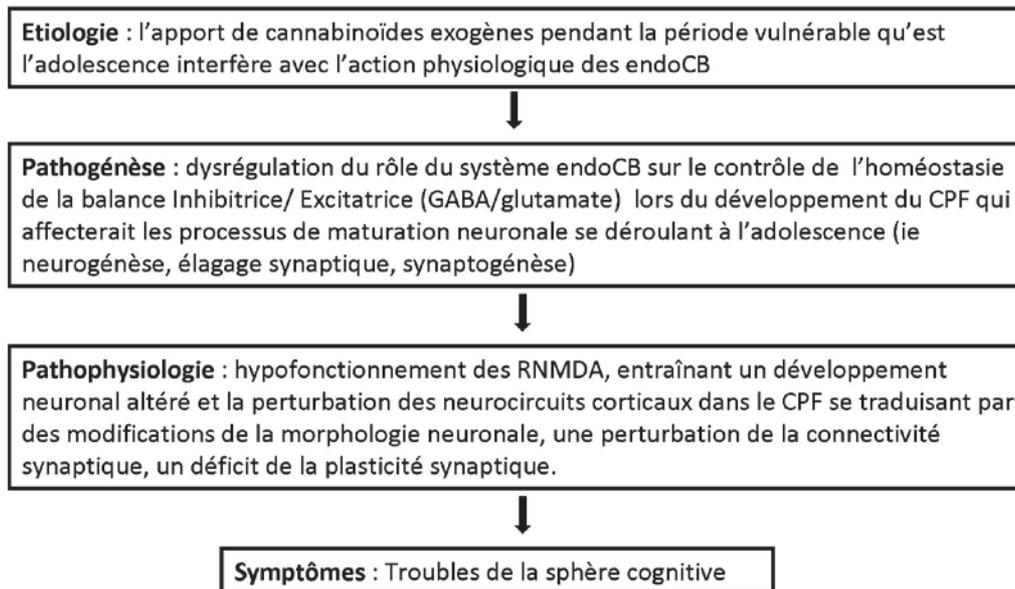


Figure 2 : De l'étiologie aux symptômes cognitifs de la schizophrénie.

E. Perspectives

Afin de compléter et d'élargir l'étude des mécanismes sous-jacents aux effets délétères à long terme d'une exposition aux cannabinoïdes exogènes sur les processus cognitifs appréhendés dans cette thèse, il serait fondamental de mesurer, dans le CPF des rats à l'âge adulte, le niveau d'expression des récepteurs NMDA (NR1, NR2A, NR2B), des récepteurs et du transporteur GABA (GABAA et GABAB; GAT1) pour préciser la présence ou non d'un dérèglement de la balance GABA/glutamate et confirmer l'hypothèse d'un hypofonctionnement glutamatergique sous-jacent au développement des troubles cognitifs à long terme. Le niveau d'expression d'autres marqueurs présynaptique tels que les protéines du complexe SNARE (SNAP-25, syntaxine, VAMP), confirmerait ou non que des modifications ont lieu à ce niveau.

L'étude de la morphologie des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe (Golgi-Cox) compléterait également ces travaux sur l'état de la fonctionnalité des connexions hippocampe-CPF.

Les expériences neurohistologiques, biochimiques et électrophysiologiques devraient également être conduites chez les rats « low responders » à l'âge adulte afin de vérifier si les déficits à long terme induits par le CP durant l'adolescence sont du même ordre que ceux précédemment décrits chez les rats « high-responders ». S'il s'avère que ceux-ci sont moins importants, cela supposerait que des vulnérabilités génétiques pourraient être à l'origine de cette différence de sensibilité à la drogue. Il serait donc intéressant d'étudier et de comparer les endophénotypes des rats « high-responders » et « low-responders » afin de mettre en évidence des différences dans les profils d'expression de certains gènes impliqués dans le développement de troubles cognitifs de la schizophrénie. Parmi les gènes candidats, ceux codant pour RGS4 (Regulator of G protein signaling 4), COMT, BDNF, GRM3 (metabotropic type II glutamate receptor), AKT1, NRG1 (neuregulin 1), ZNF804A (Zinc Finger Protein 804A),

DISC1 (disrupted in schizophrenia 1) se montrent particulièrement intéressants à explorer du fait de leur rôle dans les processus de maturation neuronale, dans la modulation de certains systèmes de neurotransmission et dans la plasticité neuronale (Bertolino et al. 2006a; Bertolino et al. 2006b; Buckholtz et al. 2007; Egan et al. 2004; Hariri et al. 2003; Hodgkinson et al. 2004; Marengo et al. 2006; Mei and Xiong 2008; Meyer-Lindenberg et al. 2005; Mirnics et al. 2001; Tan et al. 2008). Des études récentes montrent que des souris hétérozygotes pour le domaine transmembranaire de NRG1 se montrent plus sensibles aux effets aigus du THC comparativement à des souris sauvages et présentent des déficits comportementaux apparentés à ceux de la schizophrénie (Boucher et al. 2007). La perturbation d'un gène impliqué dans la schizophrénie pourrait moduler les effets des cannabinoïdes, renforçant l'idée qu'une exposition au cannabis peut précipiter le développement de troubles schizophréniques chez des individus présentant une vulnérabilité génétique.

Enfin, dans le but d'optimiser le modèle animal d'exposition aux cannabinoïdes durant l'adolescence chez le Rat, il serait intéressant de travailler sur un modèle de « double atteinte » (Nuechterlein and Dawson 1984; Zubin and Spring 1977) basé sur l'hypothèse neurodéveloppementale précoce de la schizophrénie et suggérant que des anomalies cérébrales apparues précocement lors de la vie fœtale (première atteinte) pourraient, sous l'effet de facteurs environnementaux (tels que le cannabis) entraîner une anomalie secondaire (deuxième atteinte) conduisant au développement de la schizophrénie. Les modèles de stress prénatal chez le Rat montrent que des rats issus de mères stressées au cours de la dernière semaine de gestation (du 14^{ème} au 21^{ème} jour de gestation) présentent à l'âge adulte des déficits cognitifs, des déficits d'interaction sociale, de l'anxiété et des comportements de désespoir (Bowman et al. 2004; Lemaire et al. 2000; Maccari et al. 2003; Morley-Fletcher et al. 2003; Vallee et al. 1999; Vallee et al. 1997; Weinstock 2001; Zagron and Weinstock 2006). Des anomalies de la cytoarchitecture neuronale dans le CPF et l'hippocampe, en lien avec des atrophies volumétriques de ces structures ont aussi été montrées chez ces animaux (Fujioka et al. 2006; Lemaire et al. 2000; Radley and Morrison 2005). Ainsi, l'utilisation d'un modèle de « double atteinte » (stress prénatal + exposition au CP durant l'adolescence) semble séduisant et permettrait de déterminer si un traitement aux cannabinoïdes durant l'adolescence chez des rats ayant été stressés en période prénatale entraînerait l'apparition de nouveaux comportements anormaux à l'âge adulte, apparentés par exemple à la symptomatologie positive et négative de la schizophrénie (déficits d'interaction sociale, déficit de PPI, hyperactivité) ou alors, exacerber les déficits déjà mis en évidence chez les rats exposés au CP pendant l'adolescence.

Nous avons commencé à mettre au point ce modèle au laboratoire, il serait fondamental de pouvoir l'optimiser et de poursuivre les études dans ce sens.

Bibliographie

- Abush H, Akirav I (2010) Cannabinoids modulate hippocampal memory and plasticity. *Hippocampus* 20: 1126-38
- Abush H, Akirav I (2012) Short- and long-term cognitive effects of chronic cannabinoids administration in late-adolescence rats. *PLoS One* 7: e31731
- Adriani W, Granstrem O, Macri S, Izykenova G, Dambinova S, Laviola G (2004) Behavioral and neurochemical vulnerability during adolescence in mice: studies with nicotine. *Neuropsychopharmacology* 29: 869-78
- Aggleton JP, Keen S, Warburton EC, Bussey TJ (1997) Extensive cytotoxic lesions involving both the rhinal cortices and area TE impair recognition but spare spatial alternation in the rat. *Brain Res Bull* 43: 279-87
- Aggleton JP, Kyd RJ, Bilkey DK (2004) When is the perirhinal cortex necessary for the performance of spatial memory tasks? *Neurosci Biobehav Rev* 28: 611-24
- Aguado T, Palazuelos J, Monory K, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzman M, Galve-Roperh I (2006) The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells. *J Neurosci* 26: 1551-61
- Akirav I, Maroun M (2006) Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cereb Cortex* 16: 1759-65
- Amen DG, Waugh M (1998) High resolution brain SPECT imaging of marijuana smokers with AD/HD. *J Psychoactive Drugs* 30: 209-14
- Ameri A (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol* 58: 315-48
- Ameri A, Wilhelm A, Simmet T (1999) Effects of the endogenous cannabinoid, anandamide, on neuronal activity in rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol* 126: 1831-9
- Andersen SL (2003) Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev* 27: 3-18
- Andreasson S, Allebeck P, Engstrom A, Rydberg U (1987) Cannabis and schizophrenia. A longitudinal study of Swedish conscripts. *Lancet* 2: 1483-6
- Arnold SE, Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR (1991) Some cytoarchitectural abnormalities of the entorhinal cortex in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 48: 625-32
- Arseneault L, Cannon M, Poulton R, Murray R, Caspi A, Moffitt TE (2002) Cannabis use in adolescence and risk for adult psychosis: longitudinal prospective study. *BMJ* 325: 1212-3
- Arseneault L, Cannon M, Witton J, Murray RM (2004) Causal association between cannabis and psychosis: examination of the evidence. *Br J Psychiatry* 184: 110-7
- Ashe PC, Chlan-Fourney J, Juorio AV, Li XM (2002) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA in rats with neonatal ibotenic acid lesions of the ventral hippocampus. *Brain Res* 956: 126-35
- Ashton JC, Friberg D, Darlington CL, Smith PF (2006) Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neurosci Lett* 396: 113-6
- Auclair N, Otani S, Soubrie P, Crepel F (2000) Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 83: 3287-93
- Azad SC, Monory K, Marsicano G, Cravatt BF, Lutz B, Zieglgansberger W, Rammes G (2004) Circuitry for associative plasticity in the amygdala involves endocannabinoid signaling. *J Neurosci* 24: 9953-61
- Bailey JR, Cunny HC, Paule MG, Slikker W, Jr. (1987) Fetal disposition of delta 9-tetrahydrocannabinol (THC) during late pregnancy in the rhesus monkey. *Toxicol Appl Pharmacol* 90: 315-21
- Bangalore SS, Prasad KM, Montrose DM, Goradia DD, Diwadkar VA, Keshavan MS (2008) Cannabis use and brain structural alterations in first episode schizophrenia--a region of interest, voxel based morphometric study. *Schizophr Res* 99: 1-6

BIBLIOGRAPHIE

- Bartzokis G, Beckson M, Lu PH, Nuechterlein KH, Edwards N, Mintz J (2001) Age-related changes in frontal and temporal lobe volumes in men: a magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry* 58: 461-5
- Baudelaire C (1860) *Poèmes du haschich. Les Paradis Artificiels*
- Bear MF, Malenka RC (1994) Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* 4: 389-99
- Beck F, Guignard R, Richard J-B, Tovar M-L, Spilka S (2011) Les niveaux d'usage des drogues en France en 2010. Rapport OFDT, Tendances OFDT n°76
- Behnke M, Eyler FD (1993) The consequences of prenatal substance use for the developing fetus, newborn, and young child. *Int J Addict* 28: 1341-91
- Bellon A, Krebs MO, Jay TM (2011) Factoring neurotrophins into a neurite-based pathophysiological model of schizophrenia. *Prog Neurobiol* 94: 77-90
- Benes FM, Berretta S (2001) GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 25: 1-27
- Bennett ME, Bellack AS, Gearon JS (2001) Treating substance abuse in schizophrenia. An initial report. *J Subst Abuse Treat* 20: 163-75
- Berghuis P, Dobszay MB, Wang X, Spano S, Ledda F, Sousa KM, Schulte G, Ernfors P, Mackie K, Paratcha G, Hurd YL, Harkany T (2005) Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 19115-20
- Berghuis P, Rajnec AM, Morozov YM, Ross RA, Mulder J, Urban GM, Monory K, Marsicano G, Matteoli M, Canty A, Irving AJ, Katona I, Yanagawa Y, Rakic P, Lutz B, Mackie K, Harkany T (2007) Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science* 316: 1212-6
- Berrendero F, Sepe N, Ramos JA, Di Marzo V, Fernandez-Ruiz JJ (1999) Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse* 33: 181-91
- Bertolino A, Caforio G, Petruzzella V, Latorre V, Rubino V, Dimalta S, Torraco A, Blasi G, Quartesan R, Mattay VS, Callicott JH, Weinberger DR, Scarabino T (2006a) Prefrontal dysfunction in schizophrenia controlling for COMT Val158Met genotype and working memory performance. *Psychiatry Res* 147: 221-6
- Bertolino A, Rubino V, Sambataro F, Blasi G, Latorre V, Fazio L, Caforio G, Petruzzella V, Kolachana B, Hariri A, Meyer-Lindenberg A, Nardini M, Weinberger DR, Scarabino T (2006b) Prefrontal-hippocampal coupling during memory processing is modulated by COMT val158met genotype. *Biol Psychiatry* 60: 1250-8
- Biegon A, Kerman IA (2001) Autoradiographic study of pre- and postnatal distribution of cannabinoid receptors in human brain. *Neuroimage* 14: 1463-8
- Biscaia M, Marin S, Fernandez B, Marco EM, Rubio M, Guaza C, Ambrosio E, Viveros MP (2003) Chronic treatment with CP 55,940 during the peri-adolescent period differentially affects the behavioural responses of male and female rats in adulthood. *Psychopharmacology (Berl)* 170: 301-8
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232: 331-56
- Bodor AL, Katona I, Nyiri G, Mackie K, Ledent C, Hajos N, Freund TF (2005) Endocannabinoid signaling in rat somatosensory cortex: laminar differences and involvement of specific interneuron types. *J Neurosci* 25: 6845-56
- Bouaboula M, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1995a) Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells. *J Biol Chem* 270: 13973-80
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P (1995b) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* 312 (Pt 2): 637-41

BIBLIOGRAPHIE

- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Le Fur G, Casellas P (1996) Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur J Biochem* 237: 704-11
- Bouaboula M, Rinaldi M, Carayon P, Carillon C, Delpech B, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1993) Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *Eur J Biochem* 214: 173-80
- Boucher AA, Arnold JC, Duffy L, Schofield PR, Micheau J, Karl T (2007) Heterozygous neuregulin 1 mice are more sensitive to the behavioural effects of Delta9-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology (Berl)* 192: 325-36
- Bowman RE, MacLusky NJ, Sarmiento Y, Frankfurt M, Gordon M, Luine VN (2004) Sexually dimorphic effects of prenatal stress on cognition, hormonal responses, and central neurotransmitters. *Endocrinology* 145: 3778-87
- Braff DL, Geyer MA, Light GA, Sprock J, Perry W, Cadenhead KS, Swerdlow NR (2001a) Impact of prepulse characteristics on the detection of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. *Schizophr Res* 49: 171-8
- Braff DL, Geyer MA, Swerdlow NR (2001b) Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology (Berl)* 156: 234-58
- Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Vogt LJ, Sim-Selley LJ (1999) Chronic delta9-tetrahydrocannabinol treatment produces a time-dependent loss of cannabinoid receptors and cannabinoid receptor-activated G proteins in rat brain. *J Neurochem* 73: 2447-59
- Brenowitz SD, Regehr WG (2003) Calcium dependence of retrograde inhibition by endocannabinoids at synapses onto Purkinje cells. *J Neurosci* 23: 6373-84
- Broadbelt K, Byne W, Jones LB (2002) Evidence for a decrease in basilar dendrites of pyramidal cells in schizophrenic medial prefrontal cortex. *Schizophr Res* 58: 75-81
- Brooks WJ, Petit TL, LeBoutillier JC (1997) Effect of chronic administration of NMDA antagonists on synaptic development. *Synapse* 26: 104-13
- Brown AS, Derkits EJ (2005) Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *Am J Psychiatry* 167: 261-80
- Brown SM, Wager-Miller J, Mackie K (2002) Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta* 1576: 255-64
- Brunette MF, Mueser KT, Xie H, Drake RE (1997) Relationships between symptoms of schizophrenia and substance abuse. *J Nerv Ment Dis* 185: 13-20
- Buckholtz JW, Meyer-Lindenberg A, Honea RA, Straub RE, Pezawas L, Egan MF, Vakkalanka R, Kolachana B, Verchinski BA, Sust S, Mattay VS, Weinberger DR, Callicott JH (2007) Allelic variation in RGS4 impacts functional and structural connectivity in the human brain. *J Neurosci* 27: 1584-93
- Buckley NE, Hansson S, Harta G, Mezey E (1998) Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience* 82: 1131-49
- Bussey TJ, Dias R, Redhead ES, Pearce JM, Muir JL, Aggleton JP (2000a) Intact negative patterning in rats with fornix or combined perirhinal and postrhinal cortex lesions. *Exp Brain Res* 134: 506-19
- Bussey TJ, Duck J, Muir JL, Aggleton JP (2000b) Distinct patterns of behavioural impairments resulting from fornix transection or neurotoxic lesions of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat. *Behav Brain Res* 111: 187-202
- Byrne M, Agerbo E, Bennedsen B, Eaton WW, Mortensen PB (2007) Obstetric conditions and risk of first admission with schizophrenia: a Danish national register based study. *Schizophr Res* 97: 51-9

BIBLIOGRAPHIE

- Callicott JH, Egan MF, Mattay VS, Bertolino A, Bone AD, Verchinski B, Weinberger DR (2003) Abnormal fMRI response of the dorsolateral prefrontal cortex in cognitively intact siblings of patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 160: 709-19
- Cannon M, Huttunen MO, Tanskanen AJ, Arseneault L, Jones PB, Murray RM (2002a) Perinatal and childhood risk factors for later criminality and violence in schizophrenia. Longitudinal, population-based study. *Br J Psychiatry* 180: 496-501
- Cannon M, Jones PB, Murray RM (2002b) Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. *Am J Psychiatry* 159: 1080-92
- Carlezon WA, Jr., Duman RS, Nestler EJ (2005) The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 28: 436-45
- Carlezon WA, Jr., Wise RA (1996) Rewarding actions of phencyclidine and related drugs in nucleus accumbens shell and frontal cortex. *J Neurosci* 16: 3112-22
- Carlson G, Wang Y, Alger BE (2002) Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. *Nat Neurosci* 5: 723-4
- Carlsson A, Hansson LO, Waters N, Carlsson ML (1997) Neurotransmitter aberrations in schizophrenia: new perspectives and therapeutic implications. *Life Sci* 61: 75-94
- Caspari D (1999) Cannabis and schizophrenia: results of a follow-up study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249: 45-9
- Caspi A, Moffitt TE, Cannon M, McClay J, Murray R, Harrington H, Taylor A, Arseneault L, Williams B, Braithwaite A, Poulton R, Craig IW (2005) Moderation of the effect of adolescent-onset cannabis use on adult psychosis by a functional polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene: longitudinal evidence of a gene X environment interaction. *Biol Psychiatry* 57: 1117-27
- Cerqueira JJ, Mailliet F, Almeida OF, Jay TM, Sousa N (2007) The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *J Neurosci* 27: 2781-7
- Cha YM, Jones KH, Kuhn CM, Wilson WA, Swartzwelder HS (2007) Sex differences in the effects of delta9-tetrahydrocannabinol on spatial learning in adolescent and adult rats. *Behav Pharmacol* 18: 563-9
- Cha YM, White AM, Kuhn CM, Wilson WA, Swartzwelder HS (2006) Differential effects of delta9-THC on learning in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 83: 448-55
- Chabrol H, Chauchard E, Girabet J (2008) Cannabis use and suicidal behaviours in high-school students. *Addict Behav* 33: 152-5
- Chait LD, Zacny JP (1992) Reinforcing and subjective effects of oral delta 9-THC and smoked marijuana in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 107: 255-62
- Chakrabarti A, Onaivi ES, Chaudhuri G (1995) Cloning and sequencing of a cDNA encoding the mouse brain-type cannabinoid receptor protein. *DNA Seq* 5: 385-8
- Chan PK, Yung WH (1998) Occlusion of the presynaptic action of cannabinoids in rat substantia nigra pars reticulata by cadmium. *Neurosci Lett* 249: 57-60
- Chaperon F, Soubrie P, Puech AJ, Thiebot MH (1998) Involvement of central cannabinoid (CB1) receptors in the establishment of place conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 135: 324-32
- Charalambous A, Marciniak G, Shiue CY, Dewey SL, Schlyer DJ, Wolf AP, Makriyannis A (1991) PET studies in the primate brain and biodistribution in mice using (-)-5'-18F-delta 8-THC. *Pharmacol Biochem Behav* 40: 503-7
- Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, Kolachana BS, Hyde TM, Herman MM, Apud J, Egan MF, Kleinman JE, Weinberger DR (2004) Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet* 75: 807-21
- Chevalleyre V, Castillo PE (2003) Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron* 38: 461-72

BIBLIOGRAPHIE

- Chevalyre V, Castillo PE (2004) Endocannabinoid-mediated metaplasticity in the hippocampus. *Neuron* 43: 871-81
- Chevalyre V, Takahashi KA, Castillo PE (2006) Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci* 29: 37-76
- Cleghorn JM, Kaplan RD, Szechtman B, Szechtman H, Brown GM, Franco S (1991a) Substance abuse and schizophrenia: effect on symptoms but not on neurocognitive function. *J Clin Psychiatry* 52: 26-30
- Cleghorn JM, Zipursky RB, List SJ (1991b) Structural and functional brain imaging in schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci* 16: 53-74
- Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H (1983) Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol* 334: 33-46
- Collingridge GL, Randall AD, Davies CH, Alford S (1992) The synaptic activation of NMDA receptors and Ca²⁺ signalling in neurons. *Ciba Found Symp* 164: 162-71; discussion 172-5
- Compton DR, Aceto MD, Lowe J, Martin BR (1996) In vivo characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist (SR141716A): inhibition of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced responses and apparent agonist activity. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 586-94
- Cone EJ, Huestis MA, Mitchell JM (1993) Do consecutive urine catches differ in marijuana metabolite concentration? *J Anal Toxicol* 17: 186-7
- Constantinidis C, Williams GV, Goldman-Rakic PS (2002) A role for inhibition in shaping the temporal flow of information in prefrontal cortex. *Nat Neurosci* 5: 175-80
- Costa B, Parolaro D, Colleoni M (1996) Chronic cannabinoid, CP-55,940, administration alters biotransformation in the rat. *Eur J Pharmacol* 313: 17-24
- Coyle JT (1996) The glutamatergic dysfunction hypothesis for schizophrenia. *Harv Rev Psychiatry* 3: 241-53
- Craven SE, Brecht DS (1998) PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. *Cell* 93: 495-8
- Crespo-Facorro B, Wiser AK, Andreasen NC, O'Leary DS, Watkins GL, Boles Ponto LL, Hichwa RD (2001) Neural basis of novel and well-learned recognition memory in schizophrenia: a positron emission tomography study. *Hum Brain Mapp* 12: 219-31
- Croll SD, Ip NY, Lindsay RM, Wiegand SJ (1998) Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance. *Brain Res* 812: 200-8
- Cruz DA, Eggan SM, Lewis DA (2003) Postnatal development of pre- and postsynaptic GABA markers at chandelier cell connections with pyramidal neurons in monkey prefrontal cortex. *J Comp Neurol* 465: 385-400
- D'Souza DC, Abi-Saab WM, Madonick S, Forselius-Bielen K, Doersch A, Braley G, Gueorguieva R, Cooper TB, Krystal JH (2005) Delta-9-tetrahydrocannabinol effects in schizophrenia: implications for cognition, psychosis, and addiction. *Biol Psychiatry* 57: 594-608
- D'Souza DC, Perry E, MacDougall L, Ammerman Y, Cooper T, Wu YT, Braley G, Gueorguieva R, Krystal JH (2004) The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy individuals: implications for psychosis. *Neuropsychopharmacology* 29: 1558-72
- Dahl RE (2004) Adolescent development and the regulation of behavior and emotion: introduction to part VIII. *Ann N Y Acad Sci* 1021: 294-5
- Davidson LL, Heinrichs RW (2003) Quantification of frontal and temporal lobe brain-imaging findings in schizophrenia: a meta-analysis. *Psychiatry Res* 122: 69-87
- Dean B, Sundram S, Bradbury R, Scarr E, Copolov D (2001) Studies on [3H]CP-55940 binding in the human central nervous system: regional specific changes in density of cannabinoid-1 receptors associated with schizophrenia and cannabis use. *Neuroscience* 103: 9-15
- DeCoteau WE, Kesner RP (1998) Effects of hippocampal and parietal cortex lesions on the processing of multiple-object scenes. *Behav Neurosci* 112: 68-82

BIBLIOGRAPHIE

- Degenetais E, Thierry AM, Glowinski J, Gioanni Y (2003) Synaptic influence of hippocampus on pyramidal cells of the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study. *Cereb Cortex* 13: 782-92
- Deiana S, Fattore L, Spano MS, Cossu G, Porcu E, Fadda P, Fratta W (2007) Strain and schedule-dependent differences in the acquisition, maintenance and extinction of intravenous cannabinoid self-administration in rats. *Neuropharmacology* 52: 646-54
- DeLisi LE, Sakuma M, Maurizio AM, Relja M, Hoff AL (2004) Cerebral ventricular change over the first 10 years after the onset of schizophrenia. *Psychiatry Res* 130: 57-70
- Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslin H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault JA (2003) Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci* 23: 2371-82
- Dervaux A, Laqueille X, Bourdel MC, Leborgne MH, Olie JP, Loo H, Krebs MO (2003) [Cannabis and schizophrenia: demographic and clinical correlates]. *Encephale* 29: 11-7
- Deutsch SI, Mastropaolo J, Schwartz BL, Rosse RB, Morihisa JM (1989) A "glutamatergic hypothesis" of schizophrenia. Rationale for pharmacotherapy with glycine. *Clin Neuropharmacol* 12: 1-13
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258: 1946-9
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372: 686-91
- Di Tomaso E, Cadas H, Gaillet S, Beltramo M, Desarnaud F, Venance L, Piomelli D (1997) Endogenous lipids that activate cannabinoid receptors. Formation and inactivation. *Adv Exp Med Biol* 407: 335-40
- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10819-24
- Dixon L (1999) Dual diagnosis of substance abuse in schizophrenia: prevalence and impact on outcomes. *Schizophr Res* 35 Suppl: S93-100
- Dixon L, Haas G, Weiden PJ, Sweeney J, Frances AJ (1991) Drug abuse in schizophrenic patients: clinical correlates and reasons for use. *Am J Psychiatry* 148: 224-30
- Downer EJ, Fogarty MP, Campbell VA (2003) Tetrahydrocannabinol-induced neurotoxicity depends on CB1 receptor-mediated c-Jun N-terminal kinase activation in cultured cortical neurons. *Br J Pharmacol* 140: 547-57
- Duaux E, Dervaux A (2000) Toxicomanie et Schizophrénie. *Séminaire de psychiatrie biologique de l'hôpital Sainte-Anne* 30: 93-112
- Dudek SM, Bear MF (1992) Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 4363-7
- Egan MF, Straub RE, Goldberg TE, Yakub I, Callicott JH, Hariri AR, Mattay VS, Bertolino A, Hyde TM, Shannon-Weickert C, Akil M, Crook J, Vakkalanka RK, Balkissoon R, Gibbs RA, Kleinman JE, Weinberger DR (2004) Variation in GRM3 affects cognition, prefrontal glutamate, and risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 12604-9
- Egerton A, Allison C, Brett RR, Pratt JA (2006) Cannabinoids and prefrontal cortical function: insights from preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev* 30: 680-95
- Egertova M, Giang DK, Cravatt BF, Elphick MR (1998) A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc Biol Sci* 265: 2081-5
- Ehrenreich H, Rinn T, Kunert HJ, Moeller MR, Poser W, Schilling L, Gigerenzer G, Hoehe MR (1999) Specific attentional dysfunction in adults following early start of cannabis use. *Psychopharmacology (Berl)* 142: 295-301

BIBLIOGRAPHIE

- Eisenberg DP, Berman KF (2009) Executive function, neural circuitry, and genetic mechanisms in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 35: 258-77
- El Manira A, Kyriakatos A (2010) The role of endocannabinoid signaling in motor control. *Physiology (Bethesda)* 25: 230-8
- Ellgren M, Artmann A, Tkalych O, Gupta A, Hansen HS, Hansen SH, Devi LA, Hurd YL (2008) Dynamic changes of the endogenous cannabinoid and opioid mesocorticolimbic systems during adolescence: THC effects. *Eur Neuropsychopharmacol* 18: 826-34
- Ellis GM, Jr., Mann MA, Judson BA, Schramm NT, Tashchian A (1985) Excretion patterns of cannabinoid metabolites after last use in a group of chronic users. *Clin Pharmacol Ther* 38: 572-8
- Elvevag B, Goldberg TE (2000) Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. *Crit Rev Neurobiol* 14: 1-21
- Emrich HM, Leweke FM, Schneider U (1997) Towards a cannabinoid hypothesis of schizophrenia: cognitive impairments due to dysregulation of the endogenous cannabinoid system. *Pharmacol Biochem Behav* 56: 803-7
- Ennaceur A, Aggleton JP (1997) The effects of neurotoxic lesions of the perirhinal cortex combined to fornix transection on object recognition memory in the rat. *Behav Brain Res* 88: 181-93
- Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31: 47-59
- Ennaceur A, Neave N, Aggleton JP (1997) Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp Brain Res* 113: 509-19
- Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H (1990) Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* 5: 511-26
- Eurobarometer (2011) Youth attitudes on drugs. *Eurobarometer* 330
- Fadda P, Scherma M, Spano MS, Salis P, Melis V, Fattore L, Fratta W (2006) Cannabinoid self-administration increases dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuroreport* 17: 1629-32
- Fan N, Yang H, Zhang J, Chen C (2010) Reduced expression of glutamate receptors and phosphorylation of CREB are responsible for in vivo Delta9-THC exposure-impaired hippocampal synaptic plasticity. *J Neurochem* 112: 691-702
- Farooqui AA, Rammohan KW, Horrocks LA (1989) Isolation, characterization, and regulation of diacylglycerol lipases from the bovine brain. *Ann N Y Acad Sci* 559: 25-36
- Fergusson DM, Horwood LJ, Swain-Campbell N (2002) Cannabis use and psychosocial adjustment in adolescence and young adulthood. *Addiction* 97: 1123-35
- Fernandez-Ruiz J, Berrendero F, Hernandez ML, Ramos JA (2000) The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci* 23: 14-20
- Fernandez-Ruiz J, Gomez M, Hernandez M, de Miguel R, Ramos JA (2004) Cannabinoids and gene expression during brain development. *Neurotox Res* 6: 389-401
- Fontes MA, Bolla KI, Cunha PJ, Almeida PP, Jungerman F, Laranjeira RR, Bressan RA, Lacerda AL Frontal Assessment Battery (FAB) is a simple tool for detecting executive deficits in chronic cannabis users. *J Clin Exp Neuropsychol* 33: 523-31
- Fortin DA, Trettel J, Levine ES (2004) Brief trains of action potentials enhance pyramidal neuron excitability via endocannabinoid-mediated suppression of inhibition. *J Neurophysiol* 92: 2105-12
- Fowler IL, Carr VJ, Carter NT, Lewin TJ (1998) Patterns of current and lifetime substance use in schizophrenia. *Schizophr Bull* 24: 443-55
- Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6: 119-30

BIBLIOGRAPHIE

- Freund TF (2003) Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci* 26: 489-95
- Friedman HR, Goldman-Rakic PS (1994) Coactivation of prefrontal cortex and inferior parietal cortex in working memory tasks revealed by 2DG functional mapping in the rhesus monkey. *J Neurosci* 14: 2775-88
- Fujioka A, Fujioka T, Ishida Y, Maekawa T, Nakamura S (2006) Differential effects of prenatal stress on the morphological maturation of hippocampal neurons. *Neuroscience* 141: 907-15
- Fukunaga K, Miyamoto E (1998) Role of MAP kinase in neurons. *Mol Neurobiol* 16: 79-95
- Gabriel SM, Haroutunian V, Powchik P, Honer WG, Davidson M, Davies P, Davis KL (1997) Increased concentrations of presynaptic proteins in the cingulate cortex of subjects with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 54: 559-66
- Galve-Roperh I, Sanchez C, Segui B, Haro A, Diaz-Laviada I, Levade T (1998) Evidence for the lack of involvement of sphingomyelin hydrolysis in the tumor necrosis factor-induced secretion of nerve growth factor in primary astrocyte cultures. *J Neurochem* 71: 498-505
- Gardner EL (2002) Addictive potential of cannabinoids: the underlying neurobiology. *Chem Phys Lipids* 121: 267-90
- Garrett ER (1978) Pharmacokinetics and disposition of delta 9-tetrahydrocannabinol and its metabolites. *Adv Biosci* 22-23: 105-21
- Garrett ER, Hunt CA (1974) Physicochemical properties, solubility, and protein binding of delta9-tetrahydrocannabinol. *J Pharm Sci* 63: 1056-64
- Gautier T (1846) *Le club des Hachichins. La revue des Deux-Mondes*
- Gerdeman G, Lovinger DM (2001) CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol* 85: 468-71
- Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM (2002) Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci* 5: 446-51
- Gibb R, Kolb B (1998) A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J Neurosci Methods* 79: 1-4
- Giedd JN, Blumenthal J, Jeffries NO, Castellanos FX, Liu H, Zijdenbos A, Paus T, Evans AC, Rapoport JL (1999) Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nat Neurosci* 2: 861-3
- Giroud C, Menetrey A, Augsburger M, Buclin T, Sanchez-Mazas P, Mangin P (2001) Delta(9)-THC, 11-OH-Delta(9)-THC and Delta(9)-THCCOOH plasma or serum to whole blood concentrations distribution ratios in blood samples taken from living and dead people. *Forensic Sci Int* 123: 159-64
- Giuffrida A, Leweke FM, Gerth CW, Schreiber D, Koethe D, Faulhaber J, Klosterkotter J, Piomelli D (2004) Cerebrospinal anandamide levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely correlated with psychotic symptoms. *Neuropsychopharmacology* 29: 2108-14
- Glantz LA, Lewis DA (1997) Reduction of synaptophysin immunoreactivity in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. Regional and diagnostic specificity. *Arch Gen Psychiatry* 54: 660-9
- Glass M, Dragunow M, Faull RL (1997) Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 77: 299-318
- Glass M, Northup JK (1999) Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. *Mol Pharmacol* 56: 1362-9
- Gold JM, Rehkemper G, Binks SW, 3rd, Carpenter CJ, Fleming K, Goldberg TE, Weinberger DR (2000) Learning and forgetting in schizophrenia. *J Abnorm Psychol* 109: 534-8
- Gomez O, Sanchez-Rodriguez A, Le M, Sanchez-Caro C, Molina-Holgado F, Molina-Holgado E (2011) Cannabinoid receptor agonists modulate oligodendrocyte differentiation by activating

BIBLIOGRAPHIE

- PI3K/Akt and the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways. *Br J Pharmacol* 163: 1520-32
- Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR (2006) Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 1071: 10-23
- Gonzalez S, Cebeira M, Fernandez-Ruiz J (2005) Cannabinoid tolerance and dependence: a review of studies in laboratory animals. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 300-18
- Goodrich-Hunsaker NJ, Howard BP, Hunsaker MR, Kesner RP (2008) Human topological task adapted for rats: Spatial information processes of the parietal cortex. *Neurobiol Learn Mem* 90: 389-94
- Goulle JP, Lacroix C (2006) [Which biological matrix for cannabis testing?]. *Ann Pharm Fr* 64: 181-91
- Goulle JP, Sausseureau E, Lacroix C (2008) [Delta-9-tetrahydrocannabinol pharmacokinetics]. *Ann Pharm Fr* 66: 232-44
- Grant BF, Pickering R (1998) The relationship between cannabis use and DSM-IV cannabis abuse and dependence: results from the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. *J Subst Abuse* 10: 255-64
- Green BE, Ritter C (2000) Marijuana use and depression. *J Health Soc Behav* 41: 40-9
- Green MF, Nuechterlein KH, Gold JM, Barch DM, Cohen J, Essock S, Fenton WS, Frese F, Goldberg TE, Heaton RK, Keefe RS, Kern RS, Kraemer H, Stover E, Weinberger DR, Zalcman S, Marder SR (2004) Approaching a consensus cognitive battery for clinical trials in schizophrenia: the NIMH-MATRICES conference to select cognitive domains and test criteria. *Biol Psychiatry* 56: 301-7
- Grimsey NL, Goodfellow CE, Scotter EL, Dowie MJ, Glass M, Graham ES (2008) Specific detection of CB1 receptors; cannabinoid CB1 receptor antibodies are not all created equal! *J Neurosci Methods* 171: 78-86
- Gut-Fayand A, Dervaux A, Olie JP, Loo H, Poirier MF, Krebs MO (2001) Substance abuse and suicidality in schizophrenia: a common risk factor linked to impulsivity. *Psychiatry Res* 102: 65-72
- Guzman M, Sanchez C, Galve-Roperh I (2002) Cannabinoids and cell fate. *Pharmacol Ther* 95: 175-84
- Hajos N, Katona I, Naiem SS, MacKie K, Ledent C, Mody I, Freund TF (2000) Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur J Neurosci* 12: 3239-49
- Hall W (1995) The health risks of cannabis. *Aust Fam Physician* 24: 1237-40
- Hall W, Solowij N (1998) Adverse effects of cannabis. *Lancet* 352: 1611-6
- Hampson RE, Evans GJ, Mu J, Zhuang SY, King VC, Childers SR, Deadwyler SA (1995) Role of cyclic AMP dependent protein kinase in cannabinoid receptor modulation of potassium "A-current" in cultured rat hippocampal neurons. *Life Sci* 56: 2081-8
- Hanus L, Abu-Lafi S, Frider E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R (2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3662-5
- Hariri AR, Goldberg TE, Mattay VS, Kolachana BS, Callicott JH, Egan MF, Weinberger DR (2003) Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *J Neurosci* 23: 6690-4
- Harkany T, Guzman M, Galve-Roperh I, Berghuis P, Devi LA, Mackie K (2007) The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol Sci* 28: 83-92
- Harkany T, Keimpema E, Barabas K, Mulder J (2008) Endocannabinoid functions controlling neuronal specification during brain development. *Mol Cell Endocrinol* 286: S84-90
- Harvey DJ (1990) Oxidative cleavage of the pentyl side-chain of cannabinoids. Identification of new biotransformation pathways in the metabolism of 4'-hydroxy-delta-9-tetrahydrocannabinol in the mouse. *Drug Metab Dispos* 18: 350-5
- Harvey DJ, Brown NK (1991) Comparative in vitro metabolism of the cannabinoids. *Pharmacol Biochem Behav* 40: 533-40

BIBLIOGRAPHIE

- Hashimoto T, Bergen SE, Nguyen QL, Xu B, Monteggia LM, Pierri JN, Sun Z, Sampson AR, Lewis DA (2005) Relationship of brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB to altered inhibitory prefrontal circuitry in schizophrenia. *J Neurosci* 25: 372-83
- Hashimoto Y, Ohno-Shosaku T, Maejima T, Fukami K, Kano M (2008) Pharmacological evidence for the involvement of diacylglycerol lipase in depolarization-induced endocannabinoid release. *Neuropharmacology* 54: 58-67
- Hayatbakhsh MR, Najman JM, Jamrozik K, Mamun AA, Alati R, Bor W (2007) Cannabis and anxiety and depression in young adults: a large prospective study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 46: 408-17
- Heckers S (2001) Neuroimaging studies of the hippocampus in schizophrenia. *Hippocampus* 11: 520-8
- Heckers S, Heinsen H, Geiger B, Beckmann H (1991) Hippocampal neuron number in schizophrenia. A stereological study. *Arch Gen Psychiatry* 48: 1002-8
- Heckers S, Heinsen H, Heinsen YC, Beckmann H (1990) Limbic structures and lateral ventricle in schizophrenia. A quantitative postmortem study. *Arch Gen Psychiatry* 47: 1016-22
- Heckers S, Konradi C (2002) Hippocampal neurons in schizophrenia. *J Neural Transm* 109: 891-905
- Heng L, Beverley JA, Steiner H, Tseng KY (2010) Differential developmental trajectories for CB1 cannabinoid receptor expression in limbic/associative and sensorimotor cortical areas. *Synapse* 65: 278-86
- Henquet C, Krabbendam L, Spauwen J, Kaplan C, Lieb R, Wittchen HU, van Os J (2005) Prospective cohort study of cannabis use, predisposition for psychosis, and psychotic symptoms in young people. *BMJ* 330: 11
- Henry DJ, Chavkin C (1995) Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett* 186: 91-4
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1932-6
- Hibell B, Guttormsson U, Salme Ahlström, Balakireva O, Bjarnason T, Kokkevi A, Kraus L (2012) The 2011 ESPAD report. Substance Use Among Students in 36 European Countries. CAN (Council for information on Alcohol and other Drugs)
- Higgs HN, Glomset JA (1994) Identification of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A1 from bovine brain and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9574-8
- Higuera-Matas A, Botreau F, Miguens M, Del Olmo N, Borcel E, Perez-Alvarez L, Garcia-Lecumberri C, Ambrosio E (2009) Chronic periadolescent cannabinoid treatment enhances adult hippocampal PSA-NCAM expression in male Wistar rats but only has marginal effects on anxiety, learning and memory. *Pharmacol Biochem Behav* 93: 482-90
- Hill EL, Gallopin T, Ferezou I, Cauli B, Rossier J, Schweitzer P, Lambollez B (2007) Functional CB1 receptors are broadly expressed in neocortical GABAergic and glutamatergic neurons. *J Neurophysiol* 97: 2580-9
- Hill MN, Froc DJ, Fox CJ, Gorzalka BB, Christie BR (2004) Prolonged cannabinoid treatment results in spatial working memory deficits and impaired long-term potentiation in the CA1 region of the hippocampus in vivo. *Eur J Neurosci* 20: 859-63
- Ho BC, Wassink TH, Ziebell S, Andreasen NC (2011) Cannabinoid receptor 1 gene polymorphisms and marijuana misuse interactions on white matter and cognitive deficits in schizophrenia. *Schizophr Res* 128: 66-75
- Hodgkinson CA, Goldman D, Jaeger J, Persaud S, Kane JM, Lipsky RH, Malhotra AK (2004) Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1): association with schizophrenia, schizoaffective disorder, and bipolar disorder. *Am J Hum Genet* 75: 862-72
- Hoehe MR, Caenazzo L, Martinez MM, Hsieh WT, Modi WS, Gershon ES, Bonner TI (1991) Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15. *New Biol* 3: 880-5

BIBLIOGRAPHIE

- Hofer A, Weiss EM, Golaszewski SM, Siedentopf CM, Brinkhoff C, Kremser C, Felber S, Fleischhacker WW (2003) An FMRI study of episodic encoding and recognition of words in patients with schizophrenia in remission. *Am J Psychiatry* 160: 911-8
- Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA (1990) Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J* 9: 2459-64
- Hoffman AF, Lupica CR (2001) Direct actions of cannabinoids on synaptic transmission in the nucleus accumbens: a comparison with opioids. *J Neurophysiol* 85: 72-83
- Hoffman AF, Oz M, Caulder T, Lupica CR (2003) Functional tolerance and blockade of long-term depression at synapses in the nucleus accumbens after chronic cannabinoid exposure. *J Neurosci* 23: 4815-20
- Hoffman AF, Oz M, Yang R, Lichtman AH, Lupica CR (2007) Opposing actions of chronic Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabinoid antagonists on hippocampal long-term potentiation. *Learn Mem* 14: 63-74
- Hohmann AG (2006) Localization of cannabinoid CB1 receptor mRNA using ribonucleotide probes: methods for double- and single-label in situ hybridization. *Methods Mol Med* 123: 71-89
- Hohmann AG, Herkenham M (2000) Localization of cannabinoid CB(1) receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat striatum: a double-label in situ hybridization study. *Synapse* 37: 71-80
- Honer WG, Falkai P, Young C, Wang T, Xie J, Bonner J, Hu L, Boulianne GL, Luo Z, Trimble WS (1997) Cingulate cortex synaptic terminal proteins and neural cell adhesion molecule in schizophrenia. *Neuroscience* 78: 99-110
- Horne MR, Iordanova MD, Albasser MM, Aggleton JP, Honey RC, Pearce JM (2010) Lesions of the perirhinal cortex do not impair integration of visual and geometric information in rats. *Behav Neurosci* 124: 311-20
- Hotte M, Naudon L, Jay TM (2005) Modulation of recognition and temporal order memory retrieval by dopamine D1 receptor in rats. *Neurobiol Learn Mem* 84: 85-92
- Hotte M, Thuault S, Dineley KT, Hemmings HC, Jr., Nairn AC, Jay TM (2007) Phosphorylation of CREB and DARPP-32 during late LTP at hippocampal to prefrontal cortex synapses in vivo. *Synapse* 61: 24-8
- Howlett AC (1995) Pharmacology of cannabinoid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 607-34
- Howlett AC (2002) The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 619-31
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54: 161-202
- Howlett AC, Fleming RM (1984) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* 26: 532-8
- Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736
- Huestis MA, Cone EJ (1998) Urinary excretion half-life of 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol in humans. *Ther Drug Monit* 20: 570-6
- Huestis MA, Cone EJ (2004) Relationship of Delta 9-tetrahydrocannabinol concentrations in oral fluid and plasma after controlled administration of smoked cannabis. *J Anal Toxicol* 28: 394-9
- Huestis MA, Henningfield JE, Cone EJ (1992a) Blood cannabinoids. I. Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THCCOOH during and after smoking marijuana. *J Anal Toxicol* 16: 276-82
- Huestis MA, Henningfield JE, Cone EJ (1992b) Blood cannabinoids. II. Models for the prediction of time of marijuana exposure from plasma concentrations of delta 9-tetrahydrocannabinol (THC) and 11-nor-9-carboxy-delta 9-tetrahydrocannabinol (THCCOOH). *J Anal Toxicol* 16: 283-90
- Huestis MA, Sampson AH, Holicky BJ, Henningfield JE, Cone EJ (1992c) Characterization of the absorption phase of marijuana smoking. *Clin Pharmacol Ther* 52: 31-41

BIBLIOGRAPHIE

- Irie M, Hata Y, Takeuchi M, Ichtchenko K, Toyoda A, Hirao K, Takai Y, Rosahl TW, Sudhof TC (1997) Binding of neuroligins to PSD-95. *Science* 277: 1511-5
- Ito R, Dalley JW, Howes SR, Robbins TW, Everitt BJ (2000) Dissociation in conditioned dopamine release in the nucleus accumbens core and shell in response to cocaine cues and during cocaine-seeking behavior in rats. *J Neurosci* 20: 7489-95
- Jay TM, Witter MP (1991) Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 313: 574-86
- Jay TM, Burette F, Laroche S (1995) NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the hippocampal afferent fibre system to the prefrontal cortex in the rat. *Eur J Neurosci* 7: 247-50
- Jay TM, Burette F, Laroche S (1996) Plasticity of the hippocampal-prefrontal cortex synapses. *J Physiol Paris* 90: 361-6
- Jay TM, Rocher C, Hotte M, Naudon L, Gurden H, Spedding M (2004) Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses is impaired by loss of dopamine and stress: importance for psychiatric diseases. *Neurotox Res* 6: 233-44
- Jentsch JD, Verrico CD, Le D, Roth RH (1998) Repeated exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol reduces prefrontal cortical dopamine metabolism in the rat. *Neurosci Lett* 246: 169-72
- Johansson E, Noren K, Sjoval J, Halldin MM (1989) Determination of delta 1-tetrahydrocannabinol in human fat biopsies from marihuana users by gas chromatography-mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 3: 35-8
- Kalb RG (1994) Regulation of motor neuron dendrite growth by NMDA receptor activation. *Development* 120: 3063-71
- Kalus P, Muller TJ, Zuschratter W, Senitz D (2000) The dendritic architecture of prefrontal pyramidal neurons in schizophrenic patients. *Neuroreport* 11: 3621-5
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* 89: 309-80
- Karila L, Reynaud M (2003) [Cognitive disorders and chronic use of cannabis]. *Ann Med Interne (Paris)* 154 Spec No 1: S58-64
- Karila L, Vignau J, Alter C, Reynaud M (2005) [Acute and chronic cognitive disorders caused by cannabis use]. *Rev Prat* 55: 23-6; discussion 27-9
- Karson CN, Mrak RE, Schluterman KO, Sturmer WQ, Sheng JG, Griffin WS (1999) Alterations in synaptic proteins and their encoding mRNAs in prefrontal cortex in schizophrenia: a possible neurochemical basis for 'hypofrontality'. *Mol Psychiatry* 4: 39-45
- Katona I, Rancz EA, Acsady L, Ledent C, Mackie K, Hajos N, Freund TF (2001) Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J Neurosci* 21: 9506-18
- Katona I, Urban GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF (2006) Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci* 26: 5628-37
- Katona I (2009) Endocannabinoid receptors: CNS localization of the CB(1) cannabinoid receptor. *Curr Top Behav Neurosci* 1: 65-86
- Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, Ohno-Shosaku T, Kano M (2006) The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci* 26: 2991-3001
- Khantzian EJ (1997) The self-medication hypothesis of substance use disorders: a reconsideration and recent applications. *Harv Rev Psychiatry* 4: 231-44
- Kielland KB (1992) [Urinary excretion of cannabis metabolites]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 112: 1585-6
- Kim D, Thayer SA (2001) Cannabinoids inhibit the formation of new synapses between hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 21: RC146

BIBLIOGRAPHIE

- Kim JJ, Kwon JS, Park HJ, Youn T, Kang DH, Kim MS, Lee DS, Lee MC (2003) Functional disconnection between the prefrontal and parietal cortices during working memory processing in schizophrenia: a [^{15}O] H_2O PET study. *Am J Psychiatry* 160: 919-23
- Kim E, Sheng M (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5: 771-81
- Kintz P, Cirimele V, Ludes B (2000) Detection of cannabis in oral fluid (saliva) and forehead wipes (sweat) from impaired drivers. *J Anal Toxicol* 24: 557-61
- Klein J, Karaskov T, Koren G (2000) Clinical applications of hair testing for drugs of abuse--the Canadian experience. *Forensic Sci Int* 107: 281-8
- Konick LC, Friedman L (2001) Meta-analysis of thalamic size in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 49: 28-38
- Konradi C, Heckers S (2003) Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. *Pharmacol Ther* 97: 153-79
- Kreitzer AC, Regehr WG (2001) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* 29: 717-27
- Lang C, Barco A, Zablow L, Kandel ER, Siegelbaum SA, Zakharenko SS (2004) Transient expansion of synaptically connected dendritic spines upon induction of hippocampal long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16665-70
- Laqueille X (2005) [Related, induced and associated psychiatric disorders to cannabis]. *Rev Prat* 55: 30-4
- Laqueille X, Launay C, Kanit M (2008) [Induced psychiatric and somatic disorders to cannabis]. *Ann Pharm Fr* 66: 245-54
- Larkman AU (1991) Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: III. Spine distributions. *J Comp Neurol* 306: 332-43
- Laroche S, Davis S, Jay TM (2000) Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation. *Hippocampus* 10: 438-46
- Laviola G, Adriani W, Terranova ML, Gerra G (1999) Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 993-1010
- Law B, Mason PA, Moffat AC, Gleadle RI, King LJ (1984a) Forensic aspects of the metabolism and excretion of cannabinoids following oral ingestion of cannabis resin. *J Pharm Pharmacol* 36: 289-94
- Law B, Mason PA, Moffat AC, King LJ (1984b) Confirmation of cannabis use by the analysis of delta 9-tetrahydrocannabinol metabolites in blood and urine by combined HPLC and RIA. *J Anal Toxicol* 8: 19-22
- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 283: 401-4
- Lee SF, Newton C, Widen R, Friedman H, Klein TW (2001) Differential expression of cannabinoid CB(2) receptor mRNA in mouse immune cell subpopulations and following B cell stimulation. *Eur J Pharmacol* 423: 235-41
- Legleye S, Spilka S, Nézet OL, Hassler C, Choquet M (2009) Alcool, tabac et cannabis à 16 ans. *Tendances OFDT* n°64
- Legleye S, Spilka S, Olivier Le Nézet, Beck F, Godeau E (2008) Tabac, alcool et cannabis durant la primo adolescence. *Tendances OFDT* n°59
- Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN (2000) Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11032-7
- Lenz RA, Alger BE (1999) Calcium dependence of depolarization-induced suppression of inhibition in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Physiol* 521 Pt 1: 147-57

BIBLIOGRAPHIE

- Lepore M, Vorel SR, Lowinson J, Gardner EL (1995) Conditioned place preference induced by delta 9-tetrahydrocannabinol: comparison with cocaine, morphine, and food reward. *Life Sci* 56: 2073-80
- Levenes C, Daniel H, Soubrie P, Crepel F (1998) Cannabinoids decrease excitatory synaptic transmission and impair long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* 510 (Pt 3): 867-79
- Leweke FM, Emrich HM (1999) Carbamazepine as an adjunct in the treatment of schizophrenia-like psychosis related to cannabis abuse. *Int Clin Psychopharmacol* 14: 37-9
- Leweke FM, Giuffrida A, Koethe D, Schreiber D, Nolden BM, Kranaster L, Neatby MA, Schneider M, Gerth CW, Hellmich M, Klosterkötter J, Piomelli D (2007) Anandamide levels in cerebrospinal fluid of first-episode schizophrenic patients: impact of cannabis use. *Schizophr Res* 94: 29-36
- Leweke FM, Giuffrida A, Wurster U, Emrich HM, Piomelli D (1999) Elevated endogenous cannabinoids in schizophrenia. *Neuroreport* 10: 1665-9
- Lewin GR, Barde YA (1996) Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 19: 289-317
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW (2005) Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6: 312-24
- Lewis DA, Lieberman JA (2000) Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 28: 325-34
- Linszen DH, Dingemans PM, Lenior ME (1994) Cannabis abuse and the course of recent-onset schizophrenic disorders. *Arch Gen Psychiatry* 51: 273-9
- Lipska BK, Khaing ZZ, Weickert CS, Weinberger DR (2001) BDNF mRNA expression in rat hippocampus and prefrontal cortex: effects of neonatal ventral hippocampal damage and antipsychotic drugs. *Eur J Neurosci* 14: 135-44
- Lisman JE, Coyle JT, Green RW, Javitt DC, Benes FM, Heckers S, Grace AA (2008) Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends Neurosci* 31: 234-42
- Llano I, Leresche N, Marty A (1991) Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron* 6: 565-74
- Lopez-Moreno JA, Gonzalez-Cuevas G, Moreno G, Navarro M (2008) The pharmacology of the endocannabinoid system: functional and structural interactions with other neurotransmitter systems and their repercussions in behavioral addiction. *Addict Biol* 13: 160-87
- Lu B (2003) BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem* 10: 86-98
- Luttrell LM, Daaka Y, Lefkowitz RJ (1999) Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11: 177-83
- Lynch G, Larson J, Kelso S, Barrionuevo G, Schottler F (1983) Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature* 305: 719-21
- Lynskey MT, Glowinski AL, Todorov AA, Bucholz KK, Madden PA, Nelson EC, Statham DJ, Martin NG, Heath AC (2004) Major depressive disorder, suicidal ideation, and suicide attempt in twins discordant for cannabis dependence and early-onset cannabis use. *Arch Gen Psychiatry* 61: 1026-32
- Maccari S, Darnaudery M, Morley-Fletcher S, Zuena AR, Cinque C, Van Reeth O (2003) Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 119-27
- Mailleux P, Parmentier M, Vanderhaeghen JJ (1992) Distribution of cannabinoid receptor messenger RNA in the human brain: an in situ hybridization histochemistry with oligonucleotides. *Neurosci Lett* 143: 200-4
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992a) Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 48: 655-68

BIBLIOGRAPHIE

- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992b) Localization of cannabinoid receptor in the human developing and adult basal ganglia. Higher levels in the striatonigral neurons. *Neurosci Lett* 148: 173-6
- Mailliet F, Qi H, Rocher C, Spedding M, Svenningsson P, Jay TM (2008) Protection of stress-induced impairment of hippocampal/prefrontal LTP through blockade of glucocorticoid receptors: implication of MEK signaling. *Exp Neurol* 211: 593-6
- Maison P, Walker DJ, Walsh FS, Williams G, Doherty P (2009) BDNF regulates neuronal sensitivity to endocannabinoids. *Neurosci Lett* 467: 90-4
- Malinow R, Miller JP (1986) Postsynaptic hyperpolarization during conditioning reversibly blocks induction of long-term potentiation. *Nature* 320: 529-30
- Manahan-Vaughan D, Schwegler H (2011) Strain-dependent variations in spatial learning and in hippocampal synaptic plasticity in the dentate gyrus of freely behaving rats. *Front Behav Neurosci* 5: 7
- Manzoni OJ, Bockaert J (2001) Cannabinoids inhibit GABAergic synaptic transmission in mice nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol* 412: R3-5
- Marenco S, Steele SU, Egan MF, Goldberg TE, Straub RE, Sharrief AZ, Weinberger DR (2006) Effect of metabotropic glutamate receptor 3 genotype on N-acetylaspartate measures in the dorsolateral prefrontal cortex. *Am J Psychiatry* 163: 740-2
- Marenco S, Weinberger DR (2000) The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia: following a trail of evidence from cradle to grave. *Dev Psychopathol* 12: 501-27
- Marsicano G, Lutz B (1999) Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci* 11: 4213-25
- Marsicano G, Moosmann B, Hermann H, Lutz B, Behl C (2002a) Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *J Neurochem* 80: 448-56
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglansberger W, Di Marzo V, Lutz B (2002b) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418: 530-4
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutierrez SO, van der Stelt M, Lopez-Rodriguez ML, Casanova E, Schutz G, Zieglansberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302: 84-8
- Martin BR, Compton DR, Little PJ, Martin TJ, Beardsley PM (1987) Pharmacological evaluation of agonistic and antagonistic activity of cannabinoids. *NIDA Res Monogr* 79: 108-22
- Martin LA, Wei DS, Alger BE (2001) Heterogeneous susceptibility of GABA(A) receptor-mediated IPSCs to depolarization-induced suppression of inhibition in rat hippocampus. *J Physiol* 532: 685-700
- Martin BR (2005) Role of lipids and lipid signaling in the development of cannabinoid tolerance. *Life Sci* 77: 1543-58
- Martinez-Arevalo MJ, Calcedo-Ordonez A, Varo-Prieto JR (1994) Cannabis consumption as a prognostic factor in schizophrenia. *Br J Psychiatry* 164: 679-81
- Maseda C, Hama K, Fukui Y, Matsubara K, Takahashi S, Akane A (1986) Detection of delta 9-THC in saliva by capillary GC/ECD after marijuana smoking. *Forensic Sci Int* 32: 259-66
- Mato S, Del Olmo E, Pazos A (2003) Ontogenetic development of cannabinoid receptor expression and signal transduction functionality in the human brain. *Eur J Neurosci* 17: 1747-54
- Matsuda LA (1997) Molecular aspects of cannabinoid receptors. *Crit Rev Neurobiol* 11: 143-66
- Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ (1993) Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol* 327: 535-50
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346: 561-4
- McAllister AK (2000) Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth. *Cereb Cortex* 10: 963-73

BIBLIOGRAPHIE

- McDonald AJ, Mascagni F (2001) Colocalization of calcium-binding proteins and GABA in neurons of the rat basolateral amygdala. *Neuroscience* 105: 681-93
- McGee AW, Brecht DS (2003) Assembly and plasticity of the glutamatergic postsynaptic specialization. *Curr Opin Neurobiol* 13: 111-8
- McGlashan TH, Hoffman RE (2000) Schizophrenia as a disorder of developmentally reduced synaptic connectivity. *Arch Gen Psychiatry* 57: 637-48
- McGregor IS, Issakidis CN, Prior G (1996) Aversive effects of the synthetic cannabinoid CP 55,940 in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 53: 657-64
- Meatherall RC, Warren RJ (1993) High urinary cannabinoids from a hashish body packer. *J Anal Toxicol* 17: 439-40
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50: 83-90
- Mechoulam R, Gaoni Y (1965) Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic and cannabigeronic acids. *Tetrahedron* 21: 1223-9
- Mei L, Xiong WC (2008) Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 9: 437-52
- Meier MH, Caspi A, Ambler A, Harrington H, Houts R, Keefe RS, McDonald K, Ward A, Poulton R, Moffitt TE (2012) Persistent cannabis users show neuropsychological decline from childhood to midlife. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Meyer-Lindenberg AS, Olsen RK, Kohn PD, Brown T, Egan MF, Weinberger DR, Berman KF (2005) Regionally specific disturbance of dorsolateral prefrontal-hippocampal functional connectivity in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 62: 379-86
- Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, Webster LC, Watabe AM, Makhinson M, He Y, Ramsay MF, Morris RG, Morrison JH, O'Dell TJ, Grant SG (1998) Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 396: 433-9
- Mirnics K, Middleton FA, Stanwood GD, Lewis DA, Levitt P (2001) Disease-specific changes in regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) expression in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 6: 293-301
- Mishima K, Egashira N, Matsumoto Y, Iwasaki K, Fujiwara M (2002) Involvement of reduced acetylcholine release in Delta9-tetrahydrocannabinol-induced impairment of spatial memory in the 8-arm radial maze. *Life Sci* 72: 397-407
- Molteni R, Lipska BK, Weinberger DR, Racagni G, Riva MA (2001) Developmental and stress-related changes of neurotrophic factor gene expression in an animal model of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 6: 285-92
- Monory K, Blaudzun H, Massa F, Kaiser N, Lemberger T, Schutz G, Wotjak CT, Lutz B, Marsicano G (2007) Genetic dissection of behavioural and autonomic effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *PLoS Biol* 5: e269
- Morgan NH, Stanford IM, Woodhall GL (2009) Functional CB2 type cannabinoid receptors at CNS synapses. *Neuropharmacology* 57: 356-68
- Morley-Fletcher S, Darnaudery M, Koehl M, Casolini P, Van Reeth O, Maccari S (2003) Prenatal stress in rats predicts immobility behavior in the forced swim test. Effects of a chronic treatment with tianeptine. *Brain Res* 989: 246-51
- Mu JS, Li WP, Yao ZB, Zhou XF (1999) Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. *Brain Res* 835: 259-65
- Mulder J, Aguado T, Keimpema E, Barabas K, Ballester Rosado CJ, Nguyen L, Monory K, Marsicano G, Di Marzo V, Hurd YL, Guillemot F, Mackie K, Lutz B, Guzman M, Lu HC, Galve-Roperh I, Harkany T (2008) Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8760-5

BIBLIOGRAPHIE

- Mulkey RM, Malenka RC (1992) Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 9: 967-75
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365: 61-5
- Mura P, Brunet B, Favreau F, Hauet T (2006) [Cannabis and road crashes: a survey of recent French studies]. *Ann Pharm Fr* 64: 192-6
- Nahas G (2001) The Pharmacokinetics of the THC in fat and brain: Resulting functional responses to marijuana smoking: G. Nahas, Volume 16 Issue 3, April 2001, pages 247-255. *Hum Psychopharmacol* 16: 549
- Nelson AJ, Thur KE, Marsden CA, Cassaday HJ (2010) Dissociable roles of dopamine within the core and medial shell of the nucleus accumbens in memory for objects and place. *Behav Neurosci* 124: 789-99
- Newell KA, Deng C, Huang XF (2006) Increased cannabinoid receptor density in the posterior cingulate cortex in schizophrenia. *Exp Brain Res* 172: 556-60
- Niethammer M, Kim E, Sheng M (1996) Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci* 16: 2157-63
- Nuechterlein KH, Dawson ME (1984) A heuristic vulnerability/stress model of schizophrenic episodes. *Schizophr Bull* 10: 300-12
- O'Shea M, McGregor IS, Mallet PE (2006) Repeated cannabinoid exposure during perinatal, adolescent or early adult ages produces similar longlasting deficits in object recognition and reduced social interaction in rats. *J Psychopharmacol* 20: 611-21
- O'Shea M, Singh ME, McGregor IS, Mallet PE (2004) Chronic cannabinoid exposure produces lasting memory impairment and increased anxiety in adolescent but not adult rats. *J Psychopharmacol* 18: 502-8
- Oades RD, Klimke A, Henning U, Rao ML (2002) Relations of clinical features, subgroups and medication to serum monoamines in schizophrenia. *Hum Psychopharmacol* 17: 15-27
- OEDT (2011) Etat du phénomène de la drogue en Europe. Observatoire Européen des drogues et des toxicomanies: 44-56
- Ohno-Shosaku T, Tsubokawa H, Mizushima I, Yoneda N, Zimmer A, Kano M (2002) Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses. *J Neurosci* 22: 3864-72
- Ohnuma T, Kato H, Arai H, Faull RL, McKenna PJ, Emson PC (2000) Gene expression of PSD95 in prefrontal cortex and hippocampus in schizophrenia. *Neuroreport* 11: 3133-7
- Ojeda SR, Prevot V, Heger S, Lomniczi A, Dziedzic B, Mungenast A (2003) The neurobiology of female puberty. *Horm Res* 60 Suppl 3: 15-20
- Oviedo A, Glowa J, Herkenham M (1993) Chronic cannabinoid administration alters cannabinoid receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res* 616: 293-302
- Pandolfo P, Vendruscolo LF, Sordi R, Takahashi RN (2009) Cannabinoid-induced conditioned place preference in the spontaneously hypertensive rat-an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *Psychopharmacology (Berl)* 205: 319-26
- Patton GC, Coffey C, Carlin JB, Degenhardt L, Lynskey M, Hall W (2002) Cannabis use and mental health in young people: cohort study. *BMJ* 325: 1195-8
- Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, fourth ed. Academic Press, San Diego
- Pedersen W (2008) Does cannabis use lead to depression and suicidal behaviours? A population-based longitudinal study. *Acta Psychiatr Scand* 118: 395-403
- Pelissier AL, Leonetti G, Villani P, Cianfarani F, Botta A (1997) [Cannabis: toxicokinetic focus and methodology of urinary screening]. *Therapie* 52: 213-8

BIBLIOGRAPHIE

- Peralta V, Cuesta MJ (1992) Influence of cannabis abuse on schizophrenic psychopathology. *Acta Psychiatr Scand* 85: 127-30
- Perez A, Ariza C, Sanchez-Martinez F, Nebot M (2009) Cannabis consumption initiation among adolescents: a longitudinal study. *Addict Behav* 35: 129-34
- Perrone-Bizzozero NI, Sower AC, Bird ED, Benowitz LI, Ivins KJ, Neve RL (1996) Levels of the growth-associated protein GAP-43 are selectively increased in association cortices in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14182-7
- Pertwee RG (2001) Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol* 63: 569-611
- Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4: 873-84
- Piomelli D, Beltramo M, Giuffrida A, Stella N (1998) Endogenous cannabinoid signaling. *Neurobiol Dis* 5: 462-73
- Pitler TA, Alger BE (1992) Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABA_A responses in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci* 12: 4122-32
- Pontzer NJ, Hosko MJ, Wilkison DM (1986) Alteration of electrical correlates of sensory processing by tetrahydrocannabinol. *Exp Neurol* 91: 127-35
- Poo MM (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2: 24-32
- Pope HG, Jr., Gruber AJ, Hudson JL, Huestis MA, Yurgelun-Todd D (2001) Neuropsychological performance in long-term cannabis users. *Arch Gen Psychiatry* 58: 909-15
- Pope HG, Jr., Jacobs A, Mialet JP, Yurgelun-Todd D, Gruber S (1997) Evidence for a sex-specific residual effect of cannabis on visuospatial memory. *Psychother Psychosom* 66: 179-84
- Pope HG, Jr., Yurgelun-Todd D (1996) The residual cognitive effects of heavy marijuana use in college students. *JAMA* 275: 521-7
- Preet A, Ganju RK, Groopman JE (2008) Delta9-Tetrahydrocannabinol inhibits epithelial growth factor-induced lung cancer cell migration in vitro as well as its growth and metastasis in vivo. *Oncogene* 27: 339-46
- Quinn HR, Matsumoto I, Callaghan PD, Long LE, Arnold JC, Gunasekaran N, Thompson MR, Dawson B, Mallet PE, Kashem MA, Matsuda-Matsumoto H, Iwazaki T, McGregor IS (2008) Adolescent rats find repeated Delta(9)-THC less aversive than adult rats but display greater residual cognitive deficits and changes in hippocampal protein expression following exposure. *Neuropsychopharmacology* 33: 1113-26
- Radley JJ, Morrison JH (2005) Repeated stress and structural plasticity in the brain. *Ageing Res Rev* 4: 271-87
- Rajesh M, Mukhopadhyay P, Hasko G, Huffman JW, Mackie K, Pacher P (2008) CB2 cannabinoid receptor agonists attenuate TNF-alpha-induced human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Br J Pharmacol* 153: 347-57
- Rapoport JL, Addington AM, Frangou S, Psych MR (2005) The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005. *Mol Psychiatry* 10: 434-49
- Reilly D, Didcott P, Swift W, Hall W (1998) Long-term cannabis use: characteristics of users in an Australian rural area. *Addiction* 93: 837-46
- Renard J, Krebs MO, Jay TM, Le Pen G (2012) Long-term cognitive impairments induced by chronic cannabinoid exposure during adolescence in rats: a strain comparison. *Psychopharmacology (Berl)*
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Neliat G, Caput D, et al. (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 350: 240-4
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millan J, Derocq JM, Casellas P, Congy C, Oustric D, Sarran M, Bouaboula M, Calandra B, Portier M, Shire D, Breliere JC, Le Fur GL (1998) SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 284: 644-50

BIBLIOGRAPHIE

- Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Shire D, Bouaboula M, Oustric D, Barth F, Casellas P, Ferrara P, Le Fur G (1996) Characterization of two cloned human CB1 cannabinoid receptor isoforms. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 871-8
- Robbe D, Alonso G, Duchamp F, Bockaert J, Manzoni OJ (2001) Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *J Neurosci* 21: 109-16
- Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni OJ (2002) Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8384-8
- Rocher C, Spedding M, Munoz C, Jay TM (2004) Acute stress-induced changes in hippocampal/prefrontal circuits in rats: effects of antidepressants. *Cereb Cortex* 14: 224-9
- Rodriguez de Fonseca F, Ramos JA, Bonnin A, Fernandez-Ruiz JJ (1993) Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. *Neuroreport* 4: 135-8
- Romero J, Garcia-Palomero E, Berrendero F, Garcia-Gil L, Hernandez ML, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ (1997) Atypical location of cannabinoid receptors in white matter areas during rat brain development. *Synapse* 26: 317-23
- Rubino T, Realini N, Braida D, Alberio T, Capurro V, Vigano D, Guidali C, Sala M, Fasano M, Parolaro D (2009a) The depressive phenotype induced in adult female rats by adolescent exposure to THC is associated with cognitive impairment and altered neuroplasticity in the prefrontal cortex. *Neurotox Res* 15: 291-302
- Rubino T, Realini N, Braida D, Guidi S, Capurro V, Vigano D, Guidali C, Pinter M, Sala M, Bartsaghi R, Parolaro D (2009b) Changes in hippocampal morphology and neuroplasticity induced by adolescent THC treatment are associated with cognitive impairment in adulthood. *Hippocampus* 19: 763-72
- Rubino T, Vigano D, Realini N, Guidali C, Braida D, Capurro V, Castiglioni C, Cherubino F, Romualdi P, Candeletti S, Sala M, Parolaro D (2008) Chronic delta 9-tetrahydrocannabinol during adolescence provokes sex-dependent changes in the emotional profile in adult rats: behavioral and biochemical correlates. *Neuropsychopharmacology* 33: 2760-71
- Safo PK, Regehr WG (2005) Endocannabinoids control the induction of cerebellar LTD. *Neuron* 48: 647-59
- SAMHSA (2010) Substance abuse and Mental Health Service Administration. Results from the 2010 National Survey on Drug Use and Health. National Findings, Office of Applied Studies
- Santos MS, Li H, Voglmaier SM (2009) Synaptic vesicle protein trafficking at the glutamate synapse. *Neuroscience* 158: 189-203
- Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M (1999) Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science* 284: 1845-8
- Schneider M, Koch M (2003) Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid treatment impairs sensorimotor gating, recognition memory, and the performance in a progressive ratio task in adult rats. *Neuropsychopharmacology* 28: 1760-9
- Schneider M, Koch M (2007) The effect of chronic peripubertal cannabinoid treatment on deficient object recognition memory in rats after neonatal mPFC lesion. *Eur Neuropsychopharmacol* 17: 180-6
- Schneider M, Schomig E, Leweke FM (2008) Acute and chronic cannabinoid treatment differentially affects recognition memory and social behavior in pubertal and adult rats. *Addict Biol* 13: 345-57
- Schou J, Prockop LD, Dahlstrom G, Rohde C (1977) Penetration of delta-9-tetrahydrocannabinol and 11-OH-delta-9-tetrahydrocannabinol through the blood-brain barrier. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 41: 33-8
- Schweinsburg AD, Brown SA, Tapert SF (2008) The influence of marijuana use on neurocognitive functioning in adolescents. *Curr Drug Abuse Rev* 1: 99-111
- Segal M (2005) Dendritic spines and long-term plasticity. *Nat Rev Neurosci* 6: 277-84

BIBLIOGRAPHIE

- Semple DM, McIntosh AM, Lawrie SM (2005) Cannabis as a risk factor for psychosis: systematic review. *J Psychopharmacol* 19: 187-94
- Shen M, Piser TM, Seybold VS, Thayer SA (1996) Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci* 16: 4322-34
- Sheng M, Pak DT (1999) Glutamate receptor anchoring proteins and the molecular organization of excitatory synapses. *Ann N Y Acad Sci* 868: 483-93
- Shergill SS, Brammer MJ, Williams SC, Murray RM, McGuire PK (2000) Mapping auditory hallucinations in schizophrenia using functional magnetic resonance imaging. *Arch Gen Psychiatry* 57: 1033-8
- Shibata H (1993) Efferent projections from the anterior thalamic nuclei to the cingulate cortex in the rat. *J Comp Neurol* 330: 533-42
- Sjostrom PJ, Turrigiano GG, Nelson SB (2003) Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors. *Neuron* 39: 641-54
- Smith-Kielland A, Skuterud B, Morland J (1999) Urinary excretion of 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol and cannabinoids in frequent and infrequent drug users. *J Anal Toxicol* 23: 323-32
- Solowij N, Battisti R (2008) The chronic effects of cannabis on memory in humans: a review. *Curr Drug Abuse Rev* 1: 81-98
- Solowij N, Stephens RS, Roffman RA, Babor T, Kadden R, Miller M, Christiansen K, McRee B, Vendetti J (2002) Cognitive functioning of long-term heavy cannabis users seeking treatment. *JAMA* 287: 1123-31
- Song ZH, Zhong M (2000) CB1 cannabinoid receptor-mediated cell migration. *J Pharmacol Exp Ther* 294: 204-9
- Sowell ER, Thompson PM, Holmes CJ, Jernigan TL, Toga AW (1999) In vivo evidence for post-adolescent brain maturation in frontal and striatal regions. *Nat Neurosci* 2: 859-61
- Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 417-63
- Spilka S, Nézet OL, Tovar M-L (2012) Les drogues à 17 ans: premiers résultats de l'enquête ESCAPAD 2011. Rapport OFDT Tendances OFDT n°79
- Staton PC, Hatcher JP, Walker DJ, Morrison AD, Shapland EM, Hughes JP, Chong E, Mander PK, Green PJ, Billinton A, Fulleylove M, Lancaster HC, Smith JC, Bailey LT, Wise A, Brown AJ, Richardson JC, Chessell IP (2008) The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 139: 225-36
- Stefanis NC, Delespaul P, Henquet C, Bakoula C, Stefanis CN, Van Os J (2004) Early adolescent cannabis exposure and positive and negative dimensions of psychosis. *Addiction* 99: 1333-41
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388: 773-8
- Straiker A, Mackie K (2005) Depolarization-induced suppression of excitation in murine autaptic hippocampal neurones. *J Physiol* 569: 501-17
- Straiker A, Mackie K (2007) Metabotropic suppression of excitation in murine autaptic hippocampal neurons. *J Physiol* 578: 773-85
- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M (2006) Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res* 45: 405-46
- Szabo B, Dorner L, Pfreundtner C, Norenberg W, Starke K (1998) Inhibition of GABAergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum. *Neuroscience* 85: 395-403
- Takahashi KA, Linden DJ (2000) Cannabinoid receptor modulation of synapses received by cerebellar Purkinje cells. *J Neurophysiol* 83: 1167-80
- Tan HY, Nicodemus KK, Chen Q, Li Z, Brooke JK, Honea R, Kolachana BS, Straub RE, Meyer-Lindenberg A, Sei Y, Mattay VS, Callicott JH, Weinberger DR (2008) Genetic variation in AKT1 is linked to

BIBLIOGRAPHIE

- dopamine-associated prefrontal cortical structure and function in humans. *J Clin Invest* 118: 2200-8
- Tierney PL, Degenetais E, Thierry AM, Glowinski J, Gioanni Y (2004) Influence of the hippocampus on interneurons of the rat prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 20: 514-24
- Tours Md (1845) *Du haschisch et de l'aliénation mentale: études psychologiques*. Masson
- Tracy JI, Mattson R, King C, Bundick T, Celenza MA, Glosser G (2001) A comparison of memory for verbal and non-verbal material in schizophrenia. *Schizophr Res* 50: 199-211
- Trettel J, Fortin DA, Levine ES (2004) Endocannabinoid signalling selectively targets perisomatic inhibitory inputs to pyramidal neurones in juvenile mouse neocortex. *J Physiol* 556: 95-107
- Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83: 393-411
- Tsou K, Mackie K, Sanudo-Pena MC, Walker JM (1999) Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystokinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 93: 969-75
- Uhl M (1997) Determination of drugs in hair using GC/MS/MS. *Forensic Sci Int* 84: 281-94
- Ujike H, Takaki M, Nakata K, Tanaka Y, Takeda T, Kodama M, Fujiwara Y, Sakai A, Kuroda S (2002) CNR1, central cannabinoid receptor gene, associated with susceptibility to hebephrenic schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7: 515-8
- Valk PJ, Hol S, Vankan Y, Ihle JN, Askew D, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, de Both NJ, Lowenberg B, Delwel R (1997) The genes encoding the peripheral cannabinoid receptor and alpha-L-fucosidase are located near a newly identified common virus integration site, Evi11. *J Virol* 71: 6796-804
- Vallee M, MacCari S, Dellu F, Simon H, Le Moal M, Mayo W (1999) Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat. *Eur J Neurosci* 11: 2906-16
- Vallee M, Mayo W, Dellu F, Le Moal M, Simon H, Maccari S (1997) Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J Neurosci* 17: 2626-36
- Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F (2004) Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays* 26: 445-53
- Varvel SA, Bridgen DT, Tao Q, Thomas BF, Martin BR, Lichtman AH (2005) Delta9-tetrahydrocannabinol accounts for the antinociceptive, hypothermic, and cataleptic effects of marijuana in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 314: 329-37
- Vinod KY, Hungund BL (2006) Role of the endocannabinoid system in depression and suicide. *Trends Pharmacol Sci* 27: 539-45
- Vitalis T, Laine J, Simon A, Roland A, Letierrier C, Lenkei Z (2008) The type 1 cannabinoid receptor is highly expressed in embryonic cortical projection neurons and negatively regulates neurite growth in vitro. *Eur J Neurosci* 28: 1705-18
- Viveros MP, Llorente R, Moreno E, Marco EM (2005) Behavioural and neuroendocrine effects of cannabinoids in critical developmental periods. *Behav Pharmacol* 16: 353-62
- Vogel MW, Prittie J (1995) Purkinje cell dendritic arbors in chick embryos following chronic treatment with an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *J Neurobiol* 26: 537-52
- Wall ME, Sadler BM, Brine D, Taylor H, Perez-Reyes M (1983) Metabolism, disposition, and kinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in men and women. *Clin Pharmacol Ther* 34: 352-63
- Warburton EC, Baird AL, Morgan A, Muir JL, Aggleton JP (2000) Disconnecting hippocampal projections to the anterior thalamus produces deficits on tests of spatial memory in rats. *Eur J Neurosci* 12: 1714-26
- Warburton EC, Brown MW (2009) Findings from animals concerning when interactions between perirhinal cortex, hippocampus and medial prefrontal cortex are necessary for recognition memory. *Neuropsychologia* 48: 2262-72

BIBLIOGRAPHIE

- Webster MJ, Shannon Weickert C, Herman MM, Hyde TM, Kleinman JE (2001) Synaptophysin and GAP-43 mRNA levels in the hippocampus of subjects with schizophrenia. *Schizophr Res* 49: 89-98
- Wedzony K, Fijal K, Mackowiak M (2005) Alterations in the dendritic morphology of prefrontal pyramidal neurons in adult rats after blockade of NMDA receptors in the postnatal period. *Brain Res* 1062: 166-70
- Wegener N, Koch M (2009) Behavioural disturbances and altered Fos protein expression in adult rats after chronic pubertal cannabinoid treatment. *Brain Res* 1253: 81-91
- Weickert CS, Hyde TM, Lipska BK, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE (2003) Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 8: 592-610
- Weinstock M (2001) Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog Neurobiol* 65: 427-51
- Westlake TM, Howlett AC, Bonner TI, Matsuda LA, Herkenham M (1994) Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience* 63: 637-52
- Wilson RI, Kunos G, Nicoll RA (2001) Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron* 31: 453-62
- Wilson W, Mathew R, Turkington T, Hawk T, Coleman RE, Provenzale J (2000) Brain morphological changes and early marijuana use: a magnetic resonance and positron emission tomography study. *J Addict Dis* 19: 1-22
- Wolfer DP, Lipp HP (1995) Evidence for physiological growth of hippocampal mossy fiber collaterals in the guinea pig during puberty and adulthood. *Hippocampus* 5: 329-40
- Wong AH, Van Tol HH (2003) Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 269-306
- Zagron G, Weinstock M (2006) Maternal adrenal hormone secretion mediates behavioural alterations induced by prenatal stress in male and female rats. *Behav Brain Res* 175: 323-8
- Zavitsanou K, Garrick T, Huang XF (2004) Selective antagonist [3H]SR141716A binding to cannabinoid CB1 receptors is increased in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28: 355-60
- Zhang PW, Ishiguro H, Ohtsuki T, Hess J, Carillo F, Walther D, Onaivi ES, Arinami T, Uhl GR (2004) Human cannabinoid receptor 1: 5' exons, candidate regulatory regions, polymorphisms, haplotypes and association with polysubstance abuse. *Mol Psychiatry* 9: 916-31
- Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI (1999) Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5780-5
- Zubin J, Spring B (1977) Vulnerability--a new view of schizophrenia. *J Abnorm Psychol* 86: 103-26
- Zuo Y, Lin A, Chang P, Gan WB (2005) Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron* 46: 181-9
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400: 452-7

Conséquences à long terme d'une exposition chronique aux cannabinoïdes durant l'adolescence chez le Rat : Approches comportementale, fonctionnelle et structurale.

La consommation de cannabis chez les adolescents et les jeunes adultes constitue un facteur de risque de développement de symptômes psychotiques. L'objectif de cette thèse était d'étudier les conséquences à l'âge adulte d'une exposition chronique aux cannabinoïdes pendant l'adolescence. Nous avons réalisé ces études chez le Rat et démontré que l'administration chronique d'un agoniste des récepteurs cannabinoïdes, le CP55, 940, durant l'adolescence (JPN 29 à 50) entraîne à l'âge adulte des déficits significatifs et durables de la mémoire à court terme et de la mémoire de travail spatiale. Le même traitement administré à l'âge adulte (JPN 70 à 91) n'entraîne pas de déficits cognitifs à long terme. L'apport de ces travaux et leur originalité a été de contribuer à la compréhension des mécanismes sous-jacents au développement de ces déficits cognitifs. Nous avons mis en évidence, chez ces rats à l'âge adulte, une diminution significative de l'amplitude de la PLT induite sur le circuit reliant l'hippocampe au cortex préfrontal, fortement impliqué dans les processus de mémoire et dans la physiopathologie de la schizophrénie. Ce déficit de PLT a été mis en relation avec des modifications de la morphologie des neurones pyramidaux de la couche II/III du cortex préfrontal et de certains marqueurs de la plasticité synaptique. Ces résultats confirment que l'adolescence est une période critique et vulnérable aux effets délétères des cannabinoïdes sur les processus cognitifs. L'étude des bases neurobiologiques de ces effets, en particulier en ce qui concerne les altérations des circuits préfrontaux, devrait améliorer notre compréhension des mécanismes de l'émergence de la psychose et conduire à de nouvelles stratégies thérapeutiques et de prévention.

Mots clés: cannabinoïdes, adolescence, mémoire à court terme, mémoire de travail spatiale, cortex préfrontal, hippocampe, plasticité synaptique, schizophrénie.

Long-term consequences of chronic cannabinoid exposure during adolescence in rats: Behavioral, functional and structural studies.

Cannabis use among adolescents and young adults is a risk factor for developing psychotic symptoms. The aim of this thesis was to study the consequences at different levels (behavioral, functional and structural in adulthood) of chronic exposure to synthetic cannabinoids during adolescence in the rat. We showed that chronic administration of a cannabinoid receptor agonist, CP 55940, during adolescence (PND 29-50) in rats leads to significant long-term deleterious effects in short-term memory and in spatial working memory in adulthood. The same treatment administered in adulthood (PND 70-91) does not cause long-term cognitive deficits. We further demonstrated that cannabinoid during adolescence leads in adults to a significant decrease in the expression of LTP induced in hippocampal to prefrontal cortex synapses, a circuit directly involved in memory processes and in the pathophysiology of schizophrenia. This alteration could be associated with changes in the morphology of pyramidal neurons in layer II / III of PFC and/or in the density of synaptic markers that we also identified in these cannabinoid-treated rats. These findings demonstrate that adolescence is a critical and vulnerable period to the deleterious effects of cannabinoids on cognitive processes. The neurobiological basis for this effect, especially with regard to alterations to prefrontal circuitry, which we partially provide should improve our understanding of the emergence of psychosis and lead to new therapeutic strategies and prevention.

Keywords: cannabinoids, adolescence, short-term memory, spatial working memory, prefrontal cortex, hippocampus, synaptic plasticity, schizophrenia